

Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg an der Lahn

Direktor: Prof. Dr. med. W. Straub

---

# **Über die Bedeutung des Energiestoffwechsels im Epithel der Rindercornea für ihre Transparenz**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
der hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Detlef Meyer**  
aus Berlin

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg an der Lahn  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Straub

---

# **Über die Bedeutung des Energiestoffwechsels im Epithel der Rindercornea für ihre Transparenz**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
der hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Detlef Meyer**  
aus Berlin

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Marburg am 28.11.1967  
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät  
Dekan: Prof.Dr.med.R.Siegert  
Referent: Doz.Dr.med.M.Reim  
Correferent: Prof.Dr.med.W.Straub

# INHALTSVERZEICHNIS

## I. Einleitung

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Literatureinführung..... | 1 |
| Fragestellung.....       | 2 |

## II. Methodischer Teil

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| Die Gewinnung der Gewebeproben.....                          | 4  |
| Präparation und Frierstopverfahren.....                      | 4  |
| A. Abrasio des Hornhautepithels.....                         | 4  |
| B. Normalwertserie I.....                                    | 4  |
| C. Normalwertserie II und Lagerungsversuche..                | 5  |
| Die Lagerung der Hornhäute in CO <sub>2</sub> -Atmosphäre..  | 5  |
| Die Rückführung anaerob gelagerter Hornhäute<br>in Luft..... | 6  |
| Die Extraktion.....                                          | 6  |
| Das enzymatisch-optische Verfahren.....                      | 7  |
| A. Testmethode.....                                          | 7  |
| B. Testvorschriften.....                                     | 7  |
| Die Berechnung der Metabolitkonzentration....                | 13 |

## III. Ergebnisse

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Die an den in vivo Status angenäherten<br>Metabolitgehalte im Hornhautepithel des Rindes<br>.....                                                                             | 14 |
| Vergleich der Metabolitgehalte des Epithels<br>der Rinderhornhaut mit anderen Geweben.....                                                                                    | 18 |
| Die zeitlichen Veränderungen von Metabolit-<br>gehalten im Epithel der Rinderhornhaut bei<br>Lagerung in CO <sub>2</sub> -Atmosphäre und ihre Bezie-<br>hung zur Trübung..... | 20 |
| Energiestatus und Transparenz nach Rück-<br>führung anaerob gelagerter Hornhäute in Luft                                                                                      | 30 |

#### IV. Diskussion

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| In vivo Energiestatus und Frierstopverfahren. | 34 |
| ATP/ADP-Quotient und Transparenz der Hornhaut | 34 |
| Die Redox-Quotienten im Hornhautepithel       |    |
| in CO <sub>2</sub> -Atmosphäre.....           | 37 |
| Die Änderungen der Metabolitgehalte des       |    |
| Epithels nach Rückführung anaerob ge-         |    |
| lagerter Hornhäute in Luft.....               | 39 |

#### V. Zusammenfassung

|       |    |
|-------|----|
| ..... | 42 |
|-------|----|

#### VI. Anhang

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| Abkürzungen.....              | 45 |
| Tabellen der Einzelwerte..... | 46 |
| Literaturverzeichnis.....     | 51 |

## I. EINLEITUNG

Die Hornhaut ist ein Gewebe, das in Bau und Funktion hochspezialisiert ist. Geringe Änderungen von Form und Struktur ziehen ihre besonderen optischen und mechanischen Eigenschaften in Mitleidenschaft. Zum tieferen Verständnis der Pathologie der Hornhauterkrankungen ist man bemüht, außer mit mikroskopischen und histochemischen auch mit biochemisch- analytischen Methoden den Bereich der Stoffwechselprozesse zu erschließen.

Die Behandlung von Hornhauterkrankungen ist Ziel der biochemischen Untersuchungen. Da menschliche Hornhäute nicht in genügender Zahl zur Verfügung stehen, ist man zunächst auf Analogieschlüsse vom tierischen auf menschliches Gewebe angewiesen. In dieser Hinsicht bedürfen die strukturellen und chemischen Unterschiede zwischen den Hornhäuten einzelner Spezies weiterer Klärung.

Über den anatomischen Aufbau und die chemische Zusammensetzung, die physikalisch- chemischen Eigenschaften und die Stoffwechselprozesse in den verschiedenen Schichten der Hornhaut sind umfassende Darstellungen erschienen (DAVSON, 1962; DUKE-ELDER, 1960; PIRIE und VAN HEYNINGEN, 1956; ROHEN, 1964).

Die hohen Werte bei den Messungen von Atmung und Glykolyse lassen auf einen intensiven Stoffwechsel im Epithel und Endothel schließen.

Aus den Bilanzstudien und dem Nachweis einzelner Enzyme weiß man, daß die in fast allen tierischen Zellen vorkommenden Stoffwechselwege -Glykolyse, Zitronensäure-Zyklus, Hexosephosphat-Shunt - auch in der Hornhaut vorhanden sind.

Die relative Bedeutung dieser Wege wurde von KINOSHITA, KINOSHITA und MASURAT sowie von HOLT und Mitarbeitern untersucht. Insbesondere die Untersuchungen der Enzymaktivitäten und die quantitativen Analysen der Metabolite können wichtige Hinweise auf die Bedeutung einzelner Reaktionsschritte geben. In der Literatur liegen eine Anzahl von Enzym- und Metabolitbestimmungen des Epithels verschiedener Tierarten vor, die aber nur zum Teil dem in vivo Status des Gewebes entsprechen.

Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen war es, die Gehalte der für den Energiestoffwechsel wichtigen Metabolite ATP, ADP, AMP, GLUCOSE, FDP, G-6-P, DAP,  $\alpha$ -G-P, LACTAT und PYRUVAT im Hornhautepithel des Rindes zu bestimmen<sup>x)</sup>. Mit Hilfe eines besonderen Frierstopverfahrens erhielten wir die Normalwerte in Annäherung an den in vivo Status des Gewebes (Teil I). Im II. Teil der Arbeit wurde beschrieben, welche Veränderungen der Metabolitgehalte im Epithel sich ergaben, wenn man isolierte Rinderhornhäute in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre lagerte. In einer weiteren Versuchsreihe wurden anaerob gelagerte Hornhäute in Luft zurückgeführt (Teil III).

Diese Arbeit schließt sich an Untersuchungen von ganzen Kaninchenhornhäuten an, die nach Lagerung in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre auf ihren Metabolitgehalt analysiert wurden. Auch hier wurde zur Präparation der Hornhaut das Frierstopverfahren angewendet (REIM, LICHTER). Im Vordergrund dieser Arbeit stehen indessen die Gehalte der Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels im Epithel. Dem Verhalten der Metabolite werden die Änderungen der Transparenz der Cornea gegenübergestellt. Dabei wird die Bedeutung des Energiestoffwechsels im Epithel für die Funktion der Hornhaut deutlich.

Zwar bestehen einige Unterschiede zwischen der Hornhaut vom Rind und vom Kaninchen, worauf die bisherigen Enzymbestimmungen hinweisen: z.B. liegt die Aktivität der LDH beim Kaninchen um den Faktor 10 höher als bei Katzen, Ratten, Rindern und beim Menschen; dagegen hat das Epithel

---

<sup>x)</sup> Verzeichnis der Abkürzungen s.S. 45

der Rinderhornhaut eine ungewöhnlich hohe Aktivität der TPN-abhängigen IDH. Da aber die Metabolitgehalte beim Rind und beim Kaninchen nach Untersuchungen mit SCHMIDT und REIM keine grundsätzlichen Unterschiede zeigen, werden mögliche Speziesunterschiede vernachlässigt; sie betreffen nicht die Fragestellung dieser Arbeit.

Für jede Analyse wurde das Epithel einer einzigen Rinderhornhaut verwendet. Die Fixierung des Gewebsstoffwechsels für die Metabolitbestimmungen erfolgte in Anlehnung an das von HOHORST, KREUTZ und BUCHER angegebene Frierstopverfahren. Bei den Versuchen mit der Kaninchenhornhaut benutzten REIM und SCHMIDT ein besonderes Frierstopverfahren, welches wir für die Untersuchung des Epithels der Rinderhornhaut modifizierten. Die Metabolitanalysen wurden im enzymatisch-optischen Test nach WARBURG ausgeführt. Die genauen Angaben über das Frierstopverfahren, die enzymatischen Tests sowie über Präparation und Extraktion befinden sich im methodischen Teil.

## II. METHODISCHER TEIL

In drei Versuchsserien wurden die Metabolitgehalte von ATP, ADP, AMP, Glucose, G-6-P, FDP,  $\alpha$ -G-P, DAP, Lactat und Pyruvat im Hornhautepithel des Rindes bestimmt:

- 1) Bestimmung der dem in vivo Zustand angenäherten Normalwerte mit zwei verschiedenen Frierstopmethoden (I und II).
- 2) Lagerung von isolierten Hornhäuten in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.
- 3) Überführung anaerob gelagerter Hornhäute in Luft-sauerstoff.

### Die Gewinnung der Gewebeproben

Auf dem Schlachthof wurden Rinderaugen unmittelbar post mortem enukleiert. Sie wurden einige Sekunden lang unter fließendem Wasser von Blut freigespült. Nur Augen ohne Hornhautdefekt wurden weiter verwendet. Die Hornhäute der Normalwertserie I wurden auf Eis gelagert in das Laboratorium transportiert und bis zur Präparation mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet. Die Zeit von der Enukleation bis zum Frierstop betrug 15-45 Minuten.

### Präparation und Frierstopverfahren

#### A. Abrasio des Hornhautepithels

Die Abrasio des warmen Hornhautepithels erfolgte vom frisch enukleierten Augapfel. Mit einem Hockeymesser wurde vom Hornhautrand unter mäßigem Druck das Epithel auf der festen Unterlage des Stromas nach der Hornhautmitte geschoben, von dort aufgenommen und auf der Messerspitze klebend in 2-3 Portionen in flüssigen Stickstoff getaucht. Dauer der Abrasio bis zum Frierstop: 1 Minute. Für eine Analyse genügte das Hornhautepithel eines Rinderauges.

#### B. Normalwertserie I

Nach Entfernen von Conjunctivaresten wurde die Sklera seitlich incidiert, so daß der hintere Augenpol mit einer Pinzette gefaßt werden konnte. Jetzt wurde ein in flüssigem

Stickstoff vorgekühlter flacher Leichtmetallstempel auf die Cornea gepreßt und der ganze Bulbus zwischen Pinzette und Stempel in flüssigen Stickstoff getaucht. Der Frierstop erfolgte auf dem Schlachthof 15 min nach Enukleation des Auges.

### C. Normalwertserie II und Lagerungsversuche

Nach Entfernen von Conjunctivaresten wurde die Sklera 2 mm vom Limbus entfernt mit einem Starmesser incidiert, so daß mit einigen Scherenschnitten die Cornea samt einem 2 mm breiten Skleraring excidiert werden konnte. Es wurde die Iris abgelöst und der Skleraring mit zwei Seidenfäden versehen, um daran das Präparat in einer feuchten Kammer aufzuhängen. Läsionen und Verformungen wurden sorgfältig vermieden. Dauer der Präparation: 5 min.

Für die Normalwerte anschließend, bzw. nach einer bestimmten Lagerungsperiode, erfolgte der Frierstop des bisher unberührt gebliebenen Epithels. Dafür wurde das Frierstopverfahren der Normalwertserie I (mit einem flachen Stempel für die Cornea in situ) aufgegeben. Eine saubere Abrasio des Epithels war nämlich an der stark gefälteten gefrorenen Hornhaut nicht möglich. Ein der Form der Rinderhornhaut angepaßter Hohlstempel und ein entsprechend gewölbter Leichtmetallblock wurden angefertigt. Das Sklera-Cornea-Präparat konnte nun faltenlos auf den Block aufgezogen werden. In dieser Lage wurde der Sklerastreifen schonend von der Hornhaut abgetrennt. Im anschließenden Frierstop wurde der in flüssigem Stickstoff vorgekühlte Hohlstempel 10 sec lang unter leichtem Druck auf die Hornhaut aufgesetzt und nach den Seiten gekantet. Unmittelbar nach Abnehmen des Stempels ließ man die völlig weiß gefrorene Hornhaut vom Block in flüssigen Stickstoff fallen, worin sie bis zur Extraktion aufbewahrt wurde.

### Die Lagerung der Hornhäute in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre

Als feuchte Kammer diente ein Witt'scher Topf. Nach Einleiten von CO<sub>2</sub>-Gas wurden die Hornhautpräparate darin aufgehängt. Die Qualität der CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wurde durch Ein-

halten eines brennenden Streichholzes alle drei Stunden kontrolliert. Die Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre dauerte bis zu 106 Stunden bei  $20-22^\circ\text{C}$ .

#### Die Rückführung anaerob gelagerter Hornhäute in Luft.

In dieser Versuchsserie wurden Hornhäute, die bis zu 50 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre gelagert waren, in die Luft - Atmosphäre einer feuchten Kammer überführt. Zum selben Zeitpunkt wurde eine andere, ebenso lange in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre befindliche Hornhaut mit dem Frierstopverfahren eingefroren. Es wurde damit ein vergleichbarer Ausgangswert für die Restitution in Luft erhalten.

Hornhautpräparate nach 1-,  $4\frac{1}{2}$ - und 10-stündiger Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre blieben je 1,2 und 3 Stunden in Luft. Nach 20-, 30- und 50-stündiger Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre betrug die Aufbewahrungszeit in Luft 2 Stunden. Lagerungstemperatur:  $20-22^\circ\text{C}$ .

#### Die Extraktion

Nach dem Frierstop wurde das Epithel in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff abradiert. Die mit der Pinzette gefaßte Hornhaut blieb stets untergetaucht. Die Abrasio erfolgte mit einem Messer. Nach Verdunsten des Stickstoffs wurde das noch gefrorene Epithel in ein kleines Becherglas mit 2 ml  $0,5\text{ n HClO}_4$  eingebracht und direkt gewogen (Mettler-Waage H5). Esfolgte die Extraktion in einem Glas-in-Glas Homogenisator nach Potter-Elvehjem  $2 \times 60\text{ sec}$  lang unter ständiger Kühlung im Eisbad. Nach Zentrifugation von 5 Min. bei  $10000-20000 \times g$  in der gekühlten Christ-Universal-Junior III Zentrifuge mit Hochgeschwindigkeitsaufsatz bei etwa  $+4^\circ\text{C}$  wurde der Rückstand mit  $1,0\text{ ml } 0,5\text{ n HClO}_4$  nachextrahiert und erneut zentrifugiert. Die vereinigten Zentrifugenüberstände wurden mit  $10\text{ n KOH}$  auf pH 6-6,5 neutralisiert ("getüpfelt" mit Spezial-Indikatorpapier E. Merck, Darmstadt). Abtrennen des ausgefallenen Perchlorats durch erneutes Zentrifugieren 15 Min. lang bei  $20000 \times g$  in der gekühlten Zentrifuge. Der klare Überstand wurde zur Bestimmung der Metabolitgehalte verwendet.

## Enzymatisch-optisches Verfahren

### A. Testmethode

Zur Bestimmung der Metabolitkonzentrationen im Hornhaut-epithel wurde das enzymatisch-optische Verfahren angewendet. Die Testvolumina der Arbeitsvorschriften von HOHORST, KREUTZ und BUCHER wurden für das Hornhautepithel modifiziert (REIM). Die Testansätze werden unten mitgeteilt.

Die Extinktionsmessungen wurden mit dem Photometer Eppendorf (Fa. Netheler und Hinz, Hamburg-Wellingsbüttel) mit Skalenspreizung und Registriereinrichtung vorgenommen. Es wurden Halbmikrocuvetten benutzt, meist mit einer Schichtdicke von 2 cm, für einige Metabolitbestimmungen mit einem Lichtweg von 5 cm.

Reaktionstemperatur: 25°C.

Wasserstoffionenkonzentration: pH 7,6.

Wellenlänge: 366 mμ.

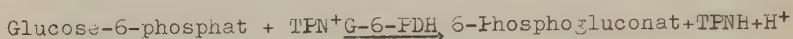
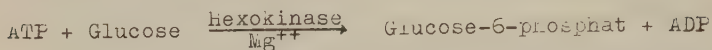
Die biochemischen Reagenzien bezogen wir von Fa. C.F. Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim-Waldhof. Anstelle von quartzdestilliertem Wasser verwendeten wir ionenfreies Wasser aus einer kleinen Wasseraufbereitungsanlage der Fa. A.Lang, Zürich 47, mit einem Leitwiderstand von mehr als 2 Meg-Ohm.

### B. Testvorschriften

Bei den Testvorschriften (S.8 ff) werden auf der linken Seite die millimolaren Konzentrationen der Reagenzien angegeben, rechts die Testzusammensetzung aus den einzelnen Reagenzien. Unter dem Strich stehen die Substanzen oder Enzyme, durch deren Zusatz in der Messcuvette die jeweiligen Testreaktionen ausgelöst werden.

## Kombinierte Bestimmung von ATP und G-6-P

Die Reaktionen:



Die Testzusammensetzung:

Schreibskala 0-0,250; 366 mμ

| <u>Halbmikrocuvette, d=2</u> |                | <u>ml</u> |
|------------------------------|----------------|-----------|
| TrisAP                       | 100 mm mit     |           |
| EDTA                         | 1 mm ; pH 7,6  | 0,20      |
| MgCl <sub>2</sub>            | 100 mm         | 0,01      |
| TFN                          | 25 mm , c = 20 | 0,02      |
| Extrakt                      |                | 0,50      |

### Bestimmung von G-6-P

|         |                |      |
|---------|----------------|------|
| G-6-FDH | c = 5 , 1 : 20 | 0,01 |
|---------|----------------|------|

nach Ablauf der Reaktion:

|         |        |      |
|---------|--------|------|
| Glucose | 100 mm | 0,01 |
|---------|--------|------|

### Bestimmung von A T P

|    |                 |      |
|----|-----------------|------|
| HK | c = 10 , 1 : 10 | 0,01 |
|----|-----------------|------|

## Kombinierte Bestimmung von ADP und AMP

Die Reaktionen:  $\text{PEP} + \text{ADP} \xrightarrow[\text{K}^+, \text{Mg}^{++}]{\text{PK}} \text{Pyruvat} + \text{ATP}$



Die Testzusammensetzung:

Diese ADP- und AMP-Bestimmung mit erhöhter Empfindlichkeit in der 5 cm Cuvette erfolgte in demselben Test im Anschluß an die nachfolgend beschriebene kombinierte Bestimmung von DAP, FDP, BTS. Das PEP-C darf erst dann zugesetzt werden, wenn der BTS-Test abgelaufen ist, da in älteren PEP-C - Lösungen BTS enthalten ist.

| <u>Halbmikrocuvette , d = 5</u> |                | <u>ml</u> |
|---------------------------------|----------------|-----------|
| TRAP                            | 100 mM mit     |           |
| EDTA                            | 1 mM ; pH 7,6  | 1,00      |
| MgCl <sub>2</sub>               | 100 mM         | 0,02      |
| DPNH                            | 11 mM , c = 8  | 0,01      |
| PEP-C                           | 32 mM , c = 15 | 0,02      |
| LDH                             | c = 5 , 1 : 10 | 0,01      |
| Extrakt                         |                | 1,00      |

### Bestimmung von A D P :

|    |                    |       |
|----|--------------------|-------|
| PK | c = 2 , unverdünnt | 0,003 |
|----|--------------------|-------|

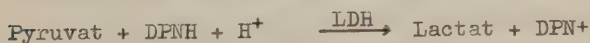
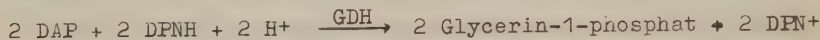
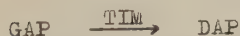
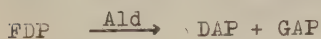
nach Ablauf der Reaktion:

### Bestimmung von A M P :

|    |               |       |
|----|---------------|-------|
| MK | c = 5 , 1 : 5 | 0,015 |
|----|---------------|-------|

## Kombinierte Bestimmung von DAP, FDP und BTS

Die Reaktionen:



Die Testzusammensetzung:

Schreibskala 0-0,250 ; 366 mμ

Halbmikrocuvette , d = 5

ml

|                   |               |      |
|-------------------|---------------|------|
| TRAP              | 100 mM mit    |      |
| EDTA              | 1 mM , pH 7,6 | 1,00 |
| MgCl <sub>2</sub> | 100 mM        | 0,02 |
| DPNH              | 11 mM         | 0,01 |
| Extrakt           |               | 1,00 |

### Bestimmung von D A P :

GDH      c = 10 , 1 : 10      0,005

Die Verdünnung der GDH-Suspension  
darf nicht älter als drei Tage sein.

Nach Ablauf der Reaktion:

### Bestimmung von F D P :

ALDTIM      1 : 20      0,01

ALDTIM ist die Mischung von

ALD      c = 10 , 1 : 20 und

TIM      c = 2 , 1 : 20.

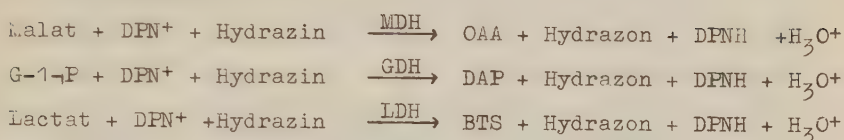
Nach Ablauf der Reaktion:

### Bestimmung von B T S :

LDH      c = 5 , 1 : 10      0,005

Kombinierte Bestimmung von L(-)-Malat,  
L(-) -Glycerophosphat und L(+)-Lactat.

Die Reaktionen:



Die Testzusammensetzung:

Schreibskala 0-0,250 ; 366 mμ

| <u>Halbmikrocuvette , d = 2</u>                                                  | <u>ml</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Hydrazinpuffer nach HOHORST:                                                     | 0,45      |
| 0,4 m Hydrazin-Sulfat                                                            |           |
| 1,0 m Glykokoll                                                                  |           |
| 0,005 m EDTA                                                                     |           |
| mit NaOH auf pH 9,5 eingestellt                                                  |           |
| ( Jeden Tag frisch neutralisiert, da der<br>alkalische Puffer nicht stabil ist.) |           |
| DPN 60 mM , c = 40                                                               | 0,05      |
| Extrakt                                                                          | 0,50      |

Bestimmung von L(-)Malat:

|     |                |      |
|-----|----------------|------|
| MDH | c = 10 , 1 : 4 | 0,02 |
|-----|----------------|------|

Nach Ablauf der Reaktion:

Bestimmung von L(-)-Glycerophosphat:

|     |                |      |
|-----|----------------|------|
| GDH | c = 10 , 1 : 4 | 0,02 |
|-----|----------------|------|

Nach Ablauf der Reaktion:

Umschalten der Schreibskala auf

0 - 1,0

Bestimmung von L(+) Lactat:

|     |               |      |
|-----|---------------|------|
| LDH | c = 5 , 1 : 2 | 0,02 |
|-----|---------------|------|

Falls die Reaktion des Lactat höhere Extinktionsunter-  
schiede als 0,700 ergibt, muß die Lactat-Bestimmung mit  
einem kleineren Einsatz wiederholt werden (Test auf S.12).

### Bestimmung von L(+) Lactat

Bei hohen Lactat-Konzentrationen, vor allem in Extrakten von Hornhautepithelien und anaerober Hornhaut.

Schreibskala 0 -1,0 , 366 mμ

| <u>Halbmikrocuvette , d = 2</u>              | <u>ml</u> |
|----------------------------------------------|-----------|
| Hydrazinpuffer nach HOHORST (siehe Seite 11) | 0,45      |
| DFN 60 mM , c = 40                           | 0,05      |
| Wasser                                       | 0,40      |
| Extrakt                                      | 0,10      |

### Bestimmung von L(+) Lactat:

LDH c = 5 , 1 : 2 0,02

Bei der Auswertung der Lactat-Bestimmung muß ein Blindwert entsprechend einer Extinktionsdifferenz von 0,012 (für d=1) bzw. 0,025 (für d=2) abgezogen werden.

### Bestimmung von D-Glucose

Die Reaktion:



Die Zusammensetzung:

Schreibskala 0-0,500 ; 366 mμ

| <u>Halbmikrocuvette , d = 2</u> | <u>ml</u> |
|---------------------------------|-----------|
| TRAP 100 ml mit                 |           |
| EDTA 1 mM , pH 7,5              | 0,50      |
| MgCl <sub>2</sub> 100 ml        | 0,01      |
| ATP 75 ml , c = 45,5            | 0,01      |
| G-6-PDH c = 5 , 1 : 10          | 0,01      |
| Extrakt                         | 0,50      |

### Bestimmung von D-Glucose:

HK c = 10 , 1 : 10 0,01

### Die Berechnung der Metabolitkonzentration

Die Berechnung der Metabolitgehalte (in n Mol/g Frischgewicht) in den Gewebsextrakten wurde nach folgender Formel ausgeführt:

$$\frac{n \text{ Mol}}{g \text{ frisch}} = \frac{\Delta E \times \text{Testvolumen} \times \text{Extraktvolumen} \times 10^9}{\epsilon \times d \times \text{Einsatzvolumen} \times \text{Gewebsgewicht}}$$

$\Delta E$  = Extinktionsdifferenz

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient  $DPN/DP_{NH_4}$  beträgt für 366 m $\mu$  und T=25°C:  $3,3 \times 10^8$ .

d = Schichtdicke der Cuvette

n Mol =  $10^{-9}$  Mol

Das Frischgewicht des Gewebes wurde aus der Relation

$$\frac{\text{Feuchtgewicht}}{\text{trockener Rückstand}} = 2,95 \pm 0,1 \text{ berechnet.}$$

### III. ERGEBNISSE

#### Die an den in vivo Status angenäherten Metabolitgehalte im Hornhautepithel des Rindes.

Zur Bestimmung der in vivo Gehalte wurden drei Versuchsserien durchgeführt:

- 1) Abrasio des Epithels in vivo (Tab.1),
- 2) Frierstopserie mit flachem Stempel,  
(Normalwerte I ; Tab. 2),
- 3) Frierstopserie mit Hohlstempel  
(Normalwerte II ; Tab. 3).

Bei der Abrasio des Epithels vom körperfrischen Augapfel wurde - im Gegensatz zu den Frierstopverfahren - der Gewebsverband vor der Fixierung des Stoffwechsels zerstört. Daraus resultierten sehr unterschiedliche Versuchsergebnisse. Sie zeigten sich besonders im Verhalten der Adenosinphosphate. Die ATP-Gehalte waren bei Abrasio in vivo stark vermindert - im Unterschied zu den Werten der Frierstopserie; dagegen waren die ADP- und AMP- Gehalte um ein Vielfaches vermehrt. Die ATP/ADP-Quotienten lagen bei Abrasio bei etwa 1,0; die Werte der Normalwertserie II lagen sehr hoch, einige Werte waren sogar größer als 20. Die scheinbaren Gleichgewichtskonstanten der Adenylat-Kinase-Reaktion waren bei der Normalwertserie II bedeutend niedriger als bei Abrasio des Epithels.

Die Redoxquotienten L/P und G/D lagen in allen drei Versuchsserien in derselben Größenordnung. Die Lactat- und Pyruvat-Gehalte, die mit dem Frierstopverfahren mit Hohlstempel gewonnen wurden, waren niedriger als beim Frierstop mit flachem Stempel und bei Abrasio in vivo. Die Gehalte von G-6-P unterschieden sich nur wenig. Der FDP-Gehalt war bei Abrasio in vivo erhöht; dagegen lag er beim Frierstop I am niedrigsten.

Die Werte bei Abrasio in vivo zeigten, daß der Gewebsstoffwechsel gegenüber dem in vivo Zustand verändert worden war. Die ATP/ADP-Quotienten, die Aufschluß über den

Tab.1: Gehalte von Metaboliten des energieliefernden Stoffwechsels im in situ abradierten Hornhaut-epithel des Rindes. Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (  $M \pm S_M$  ). Dimension: n Mol/ g Feuchtgewicht.

| Metabolit    | n | M      | $S_M$ |
|--------------|---|--------|-------|
| Lactat       | 4 | 6540   | 2971  |
| Pyruvat      | 4 | 325,5  | 48,2  |
| L / P        | 4 | 23,7   | 0,9   |
| $\alpha$ -GP | 3 | 52,4   | -     |
| DAP          | 3 | 61,2   | -     |
| G / D        | 2 | 1,6    | -     |
| G-6-P        | 4 | 171,3  | 42,6  |
| FDP          | 4 | 127,5  | 7,3   |
| Glucose      | 3 | 1047,3 | -     |
| ATP          | 4 | 1303,8 | 253,9 |
| ADP          | 4 | 1385,0 | 163,4 |
| ATP / ADP    | 4 | 1,01   | 0,3   |
| AMP          | 4 | 1442,5 | 182,1 |
| $\Sigma$ AD  | 4 | 4131,0 | 267,2 |
| Q AdK        | 4 | 1,17   | 0,26  |

Energiestatus eines Gewebes geben, lagen bei der Friestopserie mit Hohlstempel sehr hoch. Die Normalwerte II entsprechen am ehesten dem in vivo Status des Epithels der Rinderhornhaut.

Diese Werte dürfen als in vivo Vergleichswerte für die folgenden Lagerungsversuche gelten; die Hornhäute dieser Serien wurden mit derselben Technik präpariert.

Tab.2: Gehalte von Metaboliten des energieliefernden Stoffwechsels im Hornhautepithel des Rindes, dem in vivo Zustand angenähert. Frierstopverfahren mit flachem Stempel (Normalwerte I). Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte ( $M \pm S_M$ ). Dimension: n Mol/ g Feuchtgewicht.

| Metabolit    | n | M     | $S_M$ |
|--------------|---|-------|-------|
| Lactat       | 7 | 13580 | 2490  |
| Pyruvat      | 7 | 359   | 26    |
| L / P        | 7 | 37,9  | 6,5   |
| $\alpha$ -GP | 6 | 142   | 31    |
| DAP          | 4 | 55    | 15,6  |
| G / D        | 4 | 2,8   | 0,8   |
| G-6-P        | 5 | 145   | 33    |
| FDP          | 6 | 28    | 6,2   |
| Glucose      | 7 | 1842  | 283,7 |
| ATP          | 7 | 4150  | 266,2 |
| ADP          | 7 | 387   | 42,9  |
| ATP / ADP    | 7 | 11,1  | 0,9   |
| AMP          | 7 | 208   | 21,5  |
| $\Sigma$ AD  | 7 | 4745  | 309,5 |

Tab. 3: Gehalte von Metaboliten des energieliefernden Stoffwechsels im Hornhautepithel des Rindes, dem in vivo Zustand angenähert. Frierstopverfahren mit Hohlstempel (Normalwerte II). Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ). Dimension: n Mol/g Feuchtgewicht.

| Metabolit            | n  | $\bar{x}$            | $S_{\bar{x}}$        |
|----------------------|----|----------------------|----------------------|
| Lactat               | 10 | 3506                 | 333,5                |
| Pyruvat              | 12 | 195                  | 13,1                 |
| L / F                | 10 | 15,7                 | 2,6                  |
| α-Gl                 | 4  | 234                  | 15,4                 |
| DAF                  | 6  | 40,9                 | 11,5                 |
| G / D                | 3  | 7,0                  | 2,4                  |
| Malat                | 9  | 452                  | 49,6                 |
| G-5-F                | 11 | 155                  | 24,2                 |
| FDP                  | 9  | 33                   | 4,5                  |
| Glucose              | -  | -                    | -                    |
| ADP                  | 12 | 3533                 | 203,0                |
| ADP                  | 12 | 230                  | 13,2                 |
| ADP / ADP            | 12 | 15,5                 | 1,3                  |
| ADP                  | 10 | 264                  | 40,6                 |
| $\Sigma AD$          | 10 | 3304                 | 154,1                |
| $\bar{x}_{ADK}^{x)}$ | 10 | 0,063                | 0,011                |
| Glykogen $^{x)xx)}$  | 5  | $2,2 \times 10^{-5}$ | $0,5 \times 10^{-5}$ |

$^{x)}$  Absolute Werte.

$^{xx)}$  Glucose nach vollständiger Hydrolyse des Glykogen.

## Vergleich der Metabolitgehalte des Epithels der Rinderhornhaut mit anderen Geweben.

Um die Metabolitgehalte des Epithels der Rinderhornhaut besser beurteilen zu können, wurden in Tabelle 4 die Ergebnisse der Untersuchungen des Hornhautepithels in vivo beim Rind (aus Tab. 3) den Metabolitgehalten im Hornhautepithel des Kaninchens, in der Leber, im Skelettmuskel und in der Tränendrüse gegenübergestellt.

Die Lactat- und Pyruvat-Gehalte lagen im Hornhautepithel des Rindes nur wenig höher als in Leber, Muskel und Tränendrüse - im Unterschied zu den viel höheren Werten im Epithel der Kaninchenhornhaut; hier lagen die L/F-Quotienten ebenfalls höher als im Epithel der Rinderhornhaut.

Die Metabolite der Glykolysekette, G-6-P, FDP, DAP,  $\alpha$ -GP und die Glucose unterschieden sich in ihren Gehalten nicht wesentlich bei den verschiedenen Geweben. Im Vergleich zum Epithel der Kaninchenhornhaut lagen die Gehalte beim Rind niedriger. Der Gehalt an Glucose im Hornhautepithel des Rindes war niedriger als die Glucose-Gehalte aller aufgeführten Gewebsarten; im Unterschied zu den anderen Metabolitgehalten beim Rind wurde der Glucose-Gehalt nur in der Versuchsserie bestimmt, bei der zum Frierestop der flache Stempel verwendet wurde (Tab. 11, S. 47).

Die ATP-Gehalte im Hornhautepithel des Rindes lagen höher als beim Kaninchen, in der Leber und in der Tränendrüse; die ADP-Gehalte waren niedriger. Die Unterschiede in den Adenosinphosphat-Gehalten dieser Gewebe sind im Ganzen gering. Allerdings wies das Hornhautepithel des Rindes einen hohen ATP/ADP-Quotienten auf.

Das Hornhautepithel des Rindes und des Kaninchens zeichnet sich also durch hohe ATP/ADP-Quotienten und hohe L/F-Quotienten aus im Vergleich mit anderen Körpergeweben.

Tab.4: Gehalte von Metaboliten des energieliefernden Stoffwechsels in verschiedenen Geweben im in vivo Zustand ( in n Mol/ g Feuchtgewicht ).

| Metabolit    | Hornhaut-<br>epithel<br>(Rind) | Hornhaut-<br>epithel,<br>Kaninchen <sup>1)</sup> | Leber<br>2)        | Muskel<br>3) | Tränen-<br>drüse<br>4) |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------|--------------|------------------------|
| Lactat       | 3506                           | 55200                                            | 1550               | 2060         | 1202                   |
| Pyruvat      | 195                            | 1285                                             | 147                | 97           | 104                    |
| L / P        | 19,7                           | 42                                               | 10,5               | 21,3         | 11,7                   |
| $\alpha$ -GP | 234                            | 608                                              | 274                | 130          | 73                     |
| DAP          | 41                             | 134                                              | 41                 | 31           | 19                     |
| G / D        | 7                              | 4,7                                              | 6,7                | 4,2          | 4,4                    |
| Malat        | 432                            | 745                                              | 480                | 75           | 164                    |
| G-6-F        | 155                            | 165                                              | 400                | 769          | 57                     |
| FDP          | 38                             | 189                                              | 23                 | 50           | 11                     |
| Glucose      | 1842 <sup>x)</sup>             | 4900                                             | 4550 <sup>5)</sup> | 2330         | 2725                   |
| ATP          | 3583                           | 3180                                             | 3080               | 6090         | 1704                   |
| ADP          | 230                            | 277                                              | 960                | 741          | 367                    |
| ATP / ADP    | 16,6                           | 12,2                                             | 3,2                | 8,2          | 4,8                    |
| AMP          | 264                            | 972                                              | 315 <sup>6)</sup>  | 133          | 258                    |
| $\Sigma$ AD  | 3804                           | 4429                                             | 4355               | 6964         | 2329                   |

x) Einzelwert aus  
Normalwerte I (Tab.2)

1) REIM

2) HOHORST, KREUTZ und BUCHER (Werte korrigiert für  
den Blutgehalt )

3) HOHORST; HOHORST, REIM, BARTELS

4) REIM ( unveröffentlicht )

5) Rauen, Biochem. Taschenbuch Bd II, S.335, Springer  
Verl.1964

6) BARTELS, HOHORST

Die zeitlichen Veränderungen von Metabolitzgehalten im Epithel der Rinderhornhaut bei Lagerung in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und ihre Beziehung zur Trübung.

Die Ergebnisse der Bestimmungen der energiereichen Phosphatverbindungen ATP, ADP und AMP sowie der Metabolite G-6-P, FDP, Glucose,  $\alpha$ -GP, DAP, Lactat und Pyruvat im Hornhautepithel des Rindes nach verschieden langer Lagerung der isolierten Hornhaut in der CO<sub>2</sub>-Atmosphäre einer feuchten Kammer sind in den Tabellen 5 - 9 und den Abbildungen 1-7 zusammengestellt. Die Ergebnisse nach Rückführen der Hornhäute in Luft wurden zum Vergleich in die Tabellen aufgenommen. Tabelle 5 enthält ferner die Angaben über einzelne Trübungsstadien der Hornhäute bei ihrer Entnahme aus der feuchten Kammer (Trübungsgrade: klar - hauchzart - milchig - getrübt).

Die Trübung der isolierten Hornhaut setzte bei Lagerung in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre sofort ein. Schon nach einer Stunde konnte man mit bloßem Auge eine hauchzarte Trübung erkennen. Abb.1 (Seite 21) und Tab.5 (am Schluß des Kapitels) zeigen die Veränderungen der energiereichen Phosphatverbindungen. Mit dem Beginn der Eintrübung fiel die energiereichste Stufe, das ATP, im Epithel der Hornhaut steil ab. Der ATP-Gehalt betrug nach 4 Stunden Lagerung in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre nur noch die Hälfte des in vivo Gehaltes. Im Gegensatz dazu stiegen die Gehalte von ADP und AMP zunächst an: innerhalb 2 Stunden in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre vervierfachte sich der ADP-Gehalt; in derselben Zeit verdoppelte sich der AMP-Gehalt. Aus dem gegenläufigen Verhalten der ATP-Gehalte und der ADP-Gehalte resultierte ein Abfall der ATP/ADP-Quotienten vom in vivo Wert 16,6 auf 3,5 zu Beginn der Lagerung in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

Die ATP-Gehalte im Hornhautepithel sanken im Verlauf der Lagerung in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre stetig ab. Die ADP- und AMP-Gehalte kehrten nach dem initialen Anstieg auf den in vivo Stand zurück und zeigten in der folgenden Lagerungszeit keine weiteren Änderungen. Aus dem Verhalten der Adenosinphosphat-Gehalte folgte ein Wiederanstieg der ATP/ADP-

Quotienten von 5 auf etwa 6. Die Werte schwankten während einer Lagerungsdauer von 10 bis 33 Stunden zwischen 4,2 und 5,6. In dieser Periode waren die Hornhäute zunächst zart getrübt, dann milchig diffus getrübt.

Nach 33 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre waren die Hornhäute undurchsichtig-trübe. Auch die ATP/ADP-Quotienten im Hornhautepithel lagen deutlich niedriger als vorher; sie schwankten um einen Mittelwert von etwa 2.



**Abb. 1:** Graphische Darstellung der zeitlichen Änderungen der Gehalte von ATP, ADP und AMP sowie des ATP/ADP-Quotienten im Epithel der isolierten Rinderhornhaut bei Lagerung in einer feuchten Kammer über 50 Stunden bei  $20^\circ\text{C}$  und in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre.  
 1. Ordinate: ATP/ADP-Quotienten (• — •)  
 2. Ordinate: Gehalte von ATP (x --- x), ADP (o --- o), AMP (▲ — ▲) in  $\mu\text{Mol/g}$  Feuchtgewicht.  
 Abszisse: Dauer der Hornhautisolation in Stunden.

In Tab. 6 sind die zeitlichen Veränderungen der scheinbaren Gleichgewichtskonstanten ( $\approx \text{AdK}$ ) im Hornhautepithel nach Lagerung der isolierten Hornhaut in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre eingetragen. Die scheinbaren Gleichgewichtskonstanten lagen mit dem Wert 0,23 höher als die in vivo Werte des Epithels (0,07).

Jedoch blieben sie niedriger als es dem theoretischen Gleichgewicht nach dem Massenwirkungsgesetz ( $\downarrow$  AdK = 0,31, nach KALCKAR) entsprechen würde. Zu Beginn der Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre schwankten die Werte verhältnismäßig stark. Sie stiegen wohl als Folge der Gewebsalteration nach 30 Stunden stärker an.

Als Zeichen der einsetzenden Glykolyse war der G-6-P - Gehalt nach 2 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre auf das Doppelte seines in vivo Gehaltes angestiegen, der FDP-Gehalt sogar auf das Fünffache (Abb.2, Tab.7). Der Glucose-Gehalt war zu dieser Zeit bereits stark vermindert (Tab.7). Nach  $4\frac{1}{2}$  Stunden war auch der G-6-P -Gehalt unter den in vivo Gehalt gesunken. Dagegen fielen die FDP -Gehalte nur allmählich zum in vivo Niveau ab.

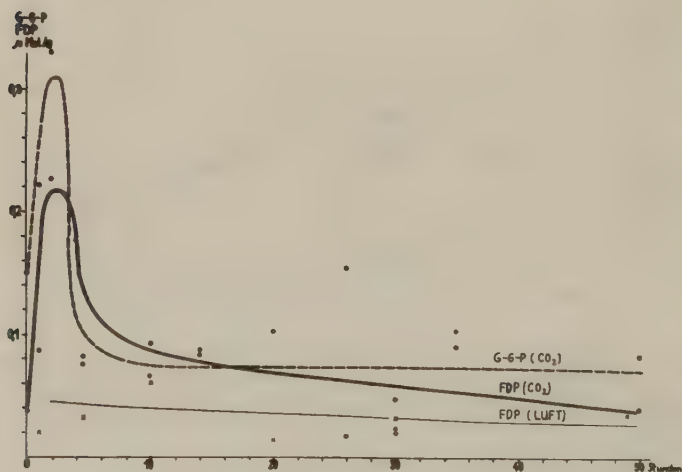


Abb.2: Graphische Darstellung der zeitlichen Änderungen der Gehalte von G-6-P und FDP im Epithel bei Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre sowie der Gehalte von FDP nach Rückführen der Hornhäute in Luft. Lagerungsbedingungen wie in Abb.1.

Ordinate: Gehalte von G-6-P (---○) und von FDP (○—○) in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre; Gehalte von FDP (—\*) in Luft in  $\mu\text{Mol/g}$  Feuchtgewicht.

Abszisse: Dauer der Hornhautisolation in Stunden.

Nach Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre stiegen die Lactat-Gehalte im Hornhautepithel an. Bereits nach einer Stunde war der Lactat-Gehalt des Epithels entsprechend der Abnahme des Glucosevorrats auf das Doppelte des in vivo Gehaltes (3500 nMol/ g Frischgewicht) angewachsen. Nach 30 bis 50 Stunden Lagerung betrug der Lactat-Gehalt 30000-40000 nMol/ g frisch. Danach sank der Lactat-Gehalt im Epithel wieder ab (Abb.3, Tab.8).

Der Pyruvat-Gehalt im Epithel verminderte sich in den ersten beiden Stunden nur wenig. Er stellte sich später in Höhe des in vivo Gehaltes ein (Abb.3, Tab.8).

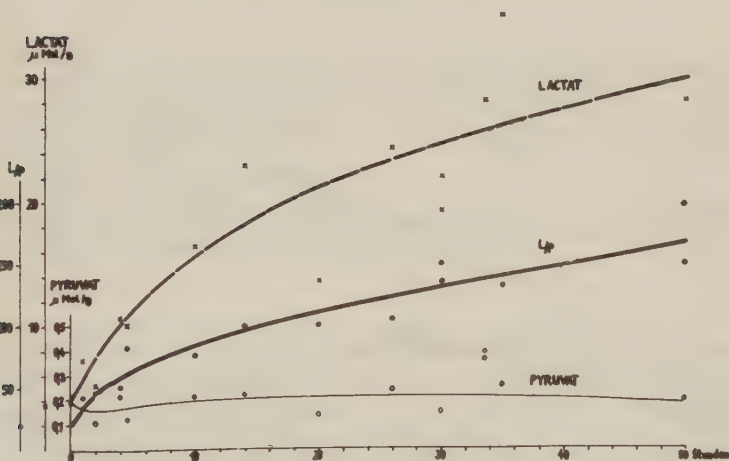


Abb.3: Graphische Darstellung der zeitlichen Änderungen der Gehalte von Lactat und Pyruvat sowie der L/P-Quotienten im Epithel der isolierten Rinderhornhaut während der Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre. Lagerungsbedingungen wie in Abb.1.

1.Ordnate: L/P-Quotienten (•—•),  
 2.Ordnate: Gehalte von Lactat (x---x) und  
 3.Ordnate: Gehalte von Pyruvat (o---o) in  $\mu\text{Mol/ g}$  frisch.  
 Abszisse : Dauer der Hornhautisolation in Stunden.

Aus der Zunahme der Lactat-Gehalte unter anaeroben Bedingungen resultierte ein Anstieg der L/P-Quotienten (Abb.3). Die Redox-Quotienten L/P im Hornhautepithel verliefen in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre den ATP/ADP-Quotienten entgegengesetzt. Dieses Verhalten wird in der graphischen Darstellung (Abb.4) deutlich, welche die Verlaufskurven beider Quotienten gegenüberstellt.

In Abb.5 (Seite 25) werden die L/P-Quotienten (Abszisse) in direkte Abhängigkeit zu den ATP/ADP-Quotienten (Ordinate) gesetzt. Jedoch kommt die umgekehrt proportionale Beziehung zwischen Energiestatus und Redoxpotential hier nicht so gut zum Ausdruck wie in Abb.4. Außer den Quotienten nach Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre wurden noch die Werte nach Rückführen der Hornhäute in Luft sowie die mittleren in vivo Quotienten in Abb.5 aufgenommen.

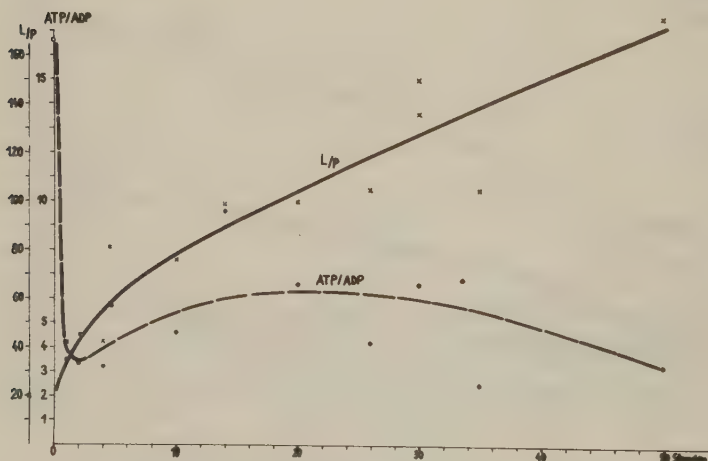


Abb.4: Das Verhalten der ATP/ADP-Quotienten und der Lactat/Pyruvat-Quotienten im Epithel der isolierten Kinderhornhaut während der Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre. Lagerungsbedingungen wie in Abb.1

1. Ordinate: L/P-Quotienten (x—x),

2. Ordinate: ATP/ADP-Quotienten (•—•),

Abszisse: Dauer der Hornhautisolation in Stunden.



Abb. 5: Die Beziehung zwischen Energiestatus und Redoxpotential im Epithel der Rinderhornhaut: a) dem in vivo Zustand angenähert, b) nach Lagerung der Hornhäute in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre und c) nach Rückführen der Hornhäute in Luft.  
 Ordinate: ATP/ADP-Quotienten  
 Abszisse: L/P-Quotienten  
 a) Normale Hornhaut (•), b) nach Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre (•), c) nach Rückführen in Luft (•).

Die Redoxpartner  $\alpha$ -GP und DAP zeigten in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre zunächst einen Anstieg (Tab. 9): der DAP-Gehalt war nach 2 Stunden am höchsten, der  $\alpha$ -GP - Gehalt nach 10 Stunden. Der raschere und relativ höhere Anstieg des DAP-Gehaltes bewirkte einen geringen Abfall des nur in der ersten Stunde erhöht gefundenen G/D-Quotienten. Die Gehalte nahmen dann wieder ab und sanken etwa gleichzeitig nach 20 Stunden unter ihre in vivo Werte. DAP wurde nach 50 Stunden im Hornhautepithel nicht mehr nachgewiesen.

**Tab.5:** Die Veränderungen der Adenosinphosphatgehalte im Hornhautepithel ( in n Mol /g feucht ).  
Die Transparenz der Hornhaut.

A. Lagerung in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre

B. Restitution in Luft

| Zeit<br>in h | n    | ATP  | ADP  | ATP<br>ADP | AMP  | ΣAD  | Transparenz  | in CO <sub>2</sub><br>Luft<br>(h) <sup>2</sup> (n) | ATP | ADP  | ATP<br>ADP | AMP  | ΣAD | Transparenz |
|--------------|------|------|------|------------|------|------|--------------|----------------------------------------------------|-----|------|------------|------|-----|-------------|
| in vivo      | 3583 | 230  | 16,6 | 264        | 3804 | klar |              | -                                                  | -   | -    | -          | -    | -   | -           |
| 1            | 4    | 2635 | 762  | 3,5        | 403  | 3800 | hauch-zart   | 1                                                  | 1   | 3140 | 288        | 11,0 | 192 | 3620 klar   |
| 2            | 1    | 2820 | 865  | 3,3        | -    | -    | "            | 1                                                  | 2   | 2740 | 189        | 14,5 | 262 | 3191 "      |
| 4            | 2    | 2015 | 629  | 3,2        | -    | -    | "            | 1                                                  | 3   | 3080 | 260        | 12,0 | 220 | 3560 "      |
| 4 1/2        | 3    | 2440 | 428  | 5,7        | 292  | 3161 | zart         | 4 1/2                                              | 1   | 2990 | 203        | 14,7 | 232 | 3425 klar   |
| -            | -    | -    | -    | -          | -    | -    | -            | 4 1/2                                              | 2   | 2520 | 262        | 9,6  | 134 | 2916 "      |
| -            | -    | -    | -    | -          | -    | -    | -            | 4 1/2                                              | 3   | 3150 | 257        | 12,3 | 252 | 3659 "      |
| 10           | 4    | 1822 | 398  | 4,6        | 182  | 2502 | zart/milchig | 10                                                 | 1   | 3200 | 220        | 14,4 | 270 | 3692 klar   |
| -            | -    | -    | -    | -          | -    | -    | -            | 10                                                 | 2   | 2170 | 136        | 16,0 | 170 | 2476 "      |
| 14           | 1    | 1770 | 184  | 9,6        | 139  | 2093 | "            | -                                                  | -   | -    | -          | -    | -   | -           |
| 20           | 1    | 1880 | 285  | 6,6        | 278  | 2443 | milchig      | 20                                                 | 2   | 2020 | 238        | 8,5  | 159 | 2433 zart   |
| 26           | 1    | 790  | 187  | 4,2        | 87   | 1064 | "            | -                                                  | -   | -    | -          | -    | -   | -           |
| 30           | 2    | 1510 | 225  | 6,6        | 203  | 1938 | " / trübe    | 30                                                 | 2   | 1980 | 173        | 11,5 | 195 | 2348 zart   |
| 33 1/2       | 1    | 1160 | 171  | 6,8        | 185  | 1516 | "            | -                                                  | -   | -    | -          | -    | -   | -           |
| 35           | 1    | 525  | 207  | 2,5        | 154  | 886  | getrübt      | -                                                  | -   | -    | -          | -    | -   | -           |
| 50           | 2    | 790  | 230  | 3,3        | 247  | 1256 | "            | -                                                  | -   | -    | -          | -    | -   | -           |
| 60           | 2    | 228  | 195  | 1,2        | 292  | 715  | "            | -                                                  | -   | -    | -          | -    | -   | -           |
| 80           | 1    | 56   | 99   | 0,6        | 235  | 390  | "            | -                                                  | -   | -    | -          | -    | -   | -           |

Tab.6: Die scheinbaren Gleichgewichts-konstanten der Adenylat-Kinase - Reaktion.

| Zeit (h) | Q AdK in CO <sub>2</sub> | -nach Rück-führen in L.(h) | Zeit |
|----------|--------------------------|----------------------------|------|
| 1        | 0,36                     | 0,05                       | 1    |
|          | 0,10                     | 0,10                       | 2    |
|          | -                        | 0,14                       | 3    |
| 4 1/2    | 0,33                     | 0,06                       | 1    |
|          | 0,13                     | 0,08                       | 2    |
|          | 0,34                     | 0,20                       | 3    |
| 10       | 0,27                     | 0,05                       | 1    |
|          | 0,23                     | 0,06                       | 2    |
| 20       | 0,16                     | 0,18                       | 2    |
| 30       | 0,19                     | 0,08                       | 2    |
| 50       | 0,31                     | 0,08                       | 2    |

Tab.7: Die Gehalte von G-6-P, FDP und Glucose im Epithel der Rinderhornhaut ( in nMol/ g Feuchtgewicht ).

| A.Lagerung in CO <sub>2</sub> -Atmo-sphäre |         |             | B.Restitution in Luft                                 |       |    |
|--------------------------------------------|---------|-------------|-------------------------------------------------------|-------|----|
| Zeit (h)                                   | n G-6-P | FDP Glucose | in CO <sub>2</sub> in G-6-P FDP (h) <sup>2</sup> Luft |       |    |
| in vivo                                    | 155     | 38          | 1774 <sup>x</sup>                                     | -     | -  |
| 1                                          | 4       | 223         | 86                                                    | 1     | 71 |
| 2                                          | 1       | 330         | 227                                                   | 1     | 2  |
| 4                                          | 2       | -           | 178                                                   | 1     | 3  |
| 4 1/2                                      | 3       | 76          | 82                                                    | 4 1/2 | 1  |
| -                                          | -       | -           | -                                                     | 4 1/2 | 2  |
| -                                          | -       | -           | -                                                     | 4 1/2 | 3  |
| 10                                         | 4       | 68          | 93                                                    | 10    | 1  |
| 14                                         | 1       | 85          | 86                                                    | 10    | 2  |
| 20                                         | 1       | 0           | 103                                                   | 20    | 2  |
| 26                                         | 1       | 157         | 18                                                    | -     | -  |
| 30                                         | 2       | 23          | 35                                                    | 30    | 2  |
| 35                                         | 2       | 104         | 91                                                    | -     | -  |
| 50                                         | 1       | 84          | 20                                                    | 50    | 2  |
| 51 1/2                                     | 1       | -           | 61                                                    | -     | -  |
| 60                                         | 2       | 247         | 38                                                    | -     | -  |
| 80                                         | 1       | 153         | 11                                                    | 50    | 2  |

x) Diese Hornhäute wurden noch mit flachem Stempel eingefroren.

Tab.8: Die Gehalte von Lactat und Pyruvat (in nMol/g frisch) im Hornhautepithel.  
Die Redox - Quotienten L/P.

| A.Lagerung in CO <sub>2</sub> -Atmosphäre |        |             |     | B.Restitution in Luft                                       |       |   |       |     |    |
|-------------------------------------------|--------|-------------|-----|-------------------------------------------------------------|-------|---|-------|-----|----|
| Zeit n<br>in h                            | Lactat | Pyruvat L/P |     | in in<br>CO <sub>2</sub> Luft Lactat Pyruvat L/P<br>(h) (h) |       |   |       |     |    |
| in vivo                                   | 3506   | 195         | 20  | -                                                           | -     | - | -     |     |    |
| 1                                         | 4      | 7100        | 170 | 42                                                          | 1     | 1 | 6100  | 126 | 49 |
| 2                                         | 1      | 5100        | 114 | 45                                                          | 1     | 2 | 6500  | 163 | 40 |
| 4                                         | 2      | 10600       | 250 | 42                                                          | 1     | 3 | 4700  | 136 | 35 |
| 4 1/2                                     | 3      | 9983        | 123 | 81                                                          | 4 1/2 | 1 | 10600 | 258 | 41 |
| -                                         | -      | -           | -   | -                                                           | 4 1/2 | 2 | 9000  | 162 | 56 |
| -                                         | -      | -           | -   | -                                                           | 4 1/2 | 3 | 8100  | 134 | 61 |
| 10                                        | 4      | 16575       | 217 | 76                                                          | 10    | 1 | 17300 | 441 | 39 |
| 14                                        | 1      | 23000       | 232 | 99                                                          | 10    | 2 | 11900 | 214 | 56 |
| 20                                        | 1      | 13600       | 137 | 100                                                         | 20    | 2 | 19100 | 344 | 56 |
| 26                                        | 1      | 24500       | 236 | 105                                                         | -     | - | -     | -   | -  |
| 30                                        | 2      | 20750       | 145 | 143                                                         | 30    | 2 | 19000 | 215 | 88 |
| 33 1/2                                    | 1      | 28400       | 390 | 73                                                          | -     | - | -     | -   | -  |
| 35                                        | 1      | 35400       | 266 | 133                                                         | -     | - | -     | -   | -  |
| 50                                        | 1      | 26700       | 133 | 200                                                         | -     | - | -     | -   | -  |
| 51 1/2                                    | 1      | 40000       | 264 | 151                                                         | 50    | 2 | 27400 | 378 | 72 |
| 59 1/2                                    | 1      | 25000       | 230 | 109                                                         |       |   |       |     |    |
| 60                                        | 1      | 24000       | 67  | 360                                                         |       |   |       |     |    |

Tab.2: Die Gehalte von -GP und DAP und die G/D-Quotienten (in nMol/g feucht).

| A. Lagerung in CO <sub>2</sub> -Atmosphäre |   |              |     |     |
|--------------------------------------------|---|--------------|-----|-----|
| Zeit<br>in h                               | n | $\alpha$ -GP | DAP | G/D |
| in vivo                                    |   | 234          | 41  | 7   |
| 1                                          | 3 | 272          | 32  | 8   |
| 2                                          | 1 | 380          | 190 | 2   |
| 4                                          | 2 | 265          | 97  | 3   |
| 4 1/2                                      | 3 | 404          | 78  | 5   |
| -                                          | - | -            | -   | -   |
| -                                          | - | -            | -   | -   |
| 10                                         | 4 | 528          | 59  | 8   |
| 14                                         | 1 | 314          | 72  | 4   |
| 20                                         | 1 | 243          | 68  | 4   |
| 26                                         | 1 | 158          | 32  | 5   |
| 30                                         | 1 | 163          | 22  | 7   |
| 30                                         | 1 | 580          | 38  | 15  |
| 33 1/2                                     | 1 | 382          | 84  | 5   |
| 35                                         | 1 | 332          | 24  | 10  |
| 50                                         | 1 | 179          | -   | -   |

| B. Restitution in Luft                |              |     |     |    |
|---------------------------------------|--------------|-----|-----|----|
| 1)Zeit2)in<br>in CO <sub>2</sub> Luft | $\alpha$ -GP | DAP | G/D |    |
| -                                     | -            | -   | -   | -  |
| 1                                     | 1            | 319 | 30  | 11 |
| 1                                     | 2            | 252 | -   | -  |
| 1                                     | 3            | 206 | -   | -  |
| 4 1/2                                 | 1            | 290 | 14  | 20 |
| 4 1/2                                 | 2            | 485 | 6   | 85 |
| 4 1/2                                 | 3            | 440 | 19  | 24 |
| 10                                    | 1            | 298 | 31  | 10 |
| 10                                    | 2            | 283 | -   | -  |
| 20                                    | 2            | 262 | 23  | 12 |
| -                                     | -            | -   | -   | -  |
| 30                                    | 2            | 435 | 28  | 16 |
| -                                     | -            | -   | -   | -  |
| -                                     | -            | -   | -   | -  |
| -                                     | -            | -   | -   | -  |
| 50                                    | 2            | 215 | 24  | 9  |

Energiestatus und Transparenz nach Rückführung  
anaerob gelagerter Hornhäute in Luft.

Nach einer Lagerung von 1 bis 50 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre wurden isolierte Rinderhornhäute in Luft zurückgebracht (s. Beschreibung S.6). Unser Interesse galt den Änderungen der Metabolitgehalte und ihrer Quotienten im Hornhautepithel, wenn es in Luft - nach längerem Aufenthalt in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre - zum Zutritt von Sauerstoff kam. Das Interesse galt ferner der Frage, ob die Trübung, welche sich bereits nach der 1. Stunde in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre gezeigt hatte, möglicherweise einen reversiblen Zustand des Gewebes darstellte.

Die ATP/ADP-Quotienten im Hornhautepithel stiegen steil an, als die isolierten Rinderhornhäute im Anschluß an die Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre während 1,2 und 3 Stunden in der Luft-Atmosphäre einer feuchten Kammer aufbewahrt wurden (Abb.6). Während die ATP/ADP-Quotienten innerhalb der ersten

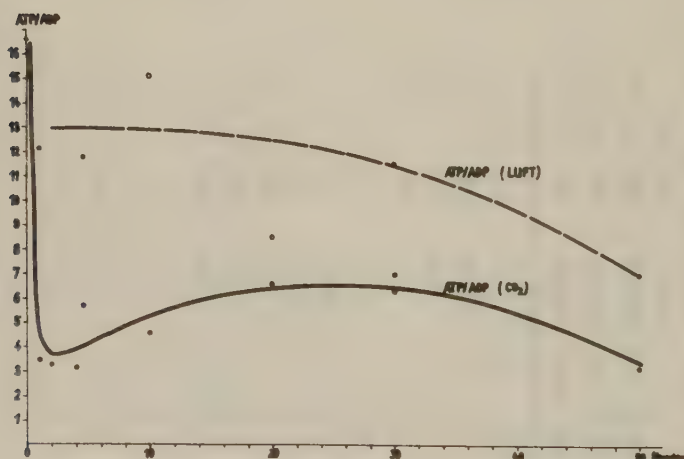


Abb.6: Die Veränderungen der ATP/ADP-quotienten im Hornhautepithel bei Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre und nach Rückführen der Hornhäute in Luft. Lagerung über 50 Stunden in einer feuchten Kammer bei 20 Grad Celsius. Ordinate: ATP/ADP-quotienten in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre ( --- ) und in Luft ( - - - ). Abszisse: Dauer der Lagerung in Stunden.

10 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre um den niedrigen Wert von 4 schwankten, kamen sie in Luft wieder den in vivo Normalwerten nahe. So wurde z.B. eine Hornhaut, welche sich 10 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre befand, anschließend 2 Stunden in Luft gelagert; dabei stieg der ATP/ADP-Quotient auf 16 an (Tab.5, S.26).

Die zarte Trübung der Hornhäute innerhalb der ersten 10 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre ging nach Aufenthalt in Luft vollkommen zurück; bereits nach einer Stunde in Luft war die Hornhaut wieder klar (Tab.5). Selbst nach 20 und 30 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre wurde ein Rückgang der Trübung wahrgenommen. Während dieser Zeit spiegelten sich die veränderten Stoffwechselbedingungen ebenfalls in einem Anstieg der ATP/ADP-quotienten im Epithel.

Wie Tab.5 zeigt, erhöhte sich nach Rückführung der Hornhäute in Luft der ATP-Gehalt des Epithels beträchtlich; auf diese Weise nahm die Summe der Adenosinphosphate zu. Der Vergleich der scheinbaren Gleichgewichtskonstanten nach Restitution in Luft ( $\lambda \text{ AdK} = 0,11$ ; als Mittelwert) und derjenigen in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre ( $\lambda \text{ AdK} = 0,23$ ; Mittelwert) läßt eine Annäherung der Werte an die Relationen der Adenosinphosphatverbindungen erkennen, die sich für den in vivo Zustand des Epithels ergaben ( $\lambda \text{ AdK} = 0,07$ ; Tab.6, S.27).

Wenn jedoch eine Lagerung von 50 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre der Rückführung in Luft vorausgegangen war, blieb die Hornhaut unverändert trübe. Der ATP/ADP-quotient im Epithel stieg nur wenig an.

Die Gehalte von G-6-P und FDP waren während der ersten Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre erhöht. Diese Werte sind in Tab.7 (Seite 27) den Änderungen der Metabolitgehalte nach Rückführung in Luft gegenübergestellt: die FDP-Gehalte stellten sich wieder in Höhe des in vivo Gehaltes ein (Abb.2, S.22); die G-6-P -Gehalte waren nach dem Anstieg in der anaeroben Phase bei Rückführung in Luft auf die Hälfte des in vivo Gehaltes vermindert.

Der erhöhte Lactat-Gehalt im Epithel der isolierten Hornhaut nach Glykolyse in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre wurde durch die

Rückführung in Luft nicht wieder verringert (Tab.8, S.25). Indessen stiegen die Pyruvat-Gehalte in Luft an. Damit fielen die L/P-quotienten ab; sie blieben allerdings über den in vivo Normalwerten (  $L/P = 20$  ). In Abb. 7 wurden die L/P-quotienten nach verschieden langer Lagerung in  $CO_2$ -Atmosphäre und nach Restitution in Luft dargestellt. Selbst nach 50 Stunden Lagerung in  $CO_2$ -Atmosphäre fielen die L/P-Quotienten noch erheblich ab, wenn die Hornhäute anschließend 2 Stunden in Luft gelagert wurden. Der Verlagerung der Quotienten-Kurven in Abb.6 und Abb.7 dürfte die Umstellung des Stoffwechsels von anaerober Glykolyse auf Sauerstoff-Atmung entsprechen.

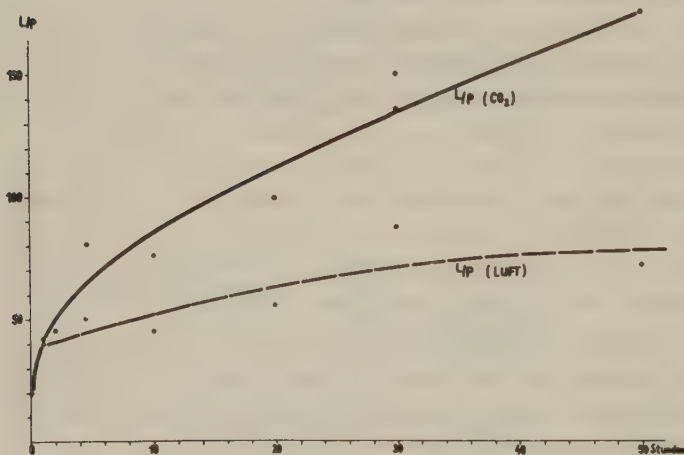


Abb.7: Die Veränderungen der L/P-quotienten im Hornhaut-epithel bei Lagerung in  $CO_2$ -Atmosphäre und nach Rückführen der Hornhäute in Luft. <sup>2</sup> Lagerungsbedingungen wie in Abb.6.  
 Ordinate: L/P-Quotienten in  $CO_2$ -Atmosphäre (•—•) und in Luft (---•).  
 Abszisse: Dauer der Lagerung in Stunden.

In Abb. 5 (S.25) wurden die ATP/ADP-Quotienten (Ordinate) in direkte Beziehung zu den L/F-Quotienten (Abszisse) gesetzt. Nach Restitution in Luft entsprechen hohe ATP/ADP-Quotienten relativ kleinen Redox-Quotienten. Eine Linearität zwischen den Bezugspunkten der Quotienten kommt unter aeroben Bedingungen eher zum Ausdruck als nach Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre.

Die Veränderungen der Gehalte der Redox-Partner  $\alpha$ -GP und DAP zeigt Tab.9 (S.29). Die Gehalte von DAP verminderten sich bei Restitution in Luft gegenüber den Gehalten in vivo und in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre. Die  $\alpha$ -GP - Gehalte blieben trotz Abnahme bei Restitution in Luft über den in vivo Gehalten. Dementsprechend lagen die G/D-Quotienten nach Rückführen in Luft höher als in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre.

#### IV. DISKUSSION

##### In vivo Energiestatus und Friertopverfahren.

Die Bestimmung der in vivo Gehalte von Metaboliten hängt wesentlich von der Art der Präparation ab. Verschiedene Methoden, die Abrasio des Epithels vom körperfrischen Aug-  
apfel, das Einfrieren und das Wiederauftauen der Hornhaut vor der Fixierung des Gewebsstoffwechsels durch Friertop führten zu sehr viel anderen Ergebnissen des ATP/ADP-  
Quotienten als die Anwendung des oben beschriebenen Friertopverfahrens (Normalwertserie II, S.5). Bei diesen Alterationen des Gewebes fiel der ATP/ADP-Quotient schnell ab. Eine Annäherung an den in vivo Energiestatus wurde nur mit dem sofortigen Friertop erzielt.

##### ATP/ADP-quotient und Transparenz der Hornhaut.

Das Verhältnis ATP/ADP gibt Aufschluß über den Energiestatus eines Gewebes. ATP wird vor allem durch oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien synthetisiert. Wenn der Sauerstoff für die oxydative Phosphorylierung fehlt, sinken der ATP-Spiegel und der ATP/ADP-Quotient. Als Folge des herabgesetzten Energiepotentials ist die Funktion des Gewebes gestört.

Eine Beziehung zwischen Funktion und Energiestatus fanden LUNK und WALLER für Erythrocyten und Thrombocyten. Sie wurde von HOHORST, REIM und BARTELS für den arbeitenden Muskel gefunden. HARRIS und DAVSON zeigten, daß die Klarheit der Hornhaut vom ihrem Energiestoffwechsel abhängt. Die Trübung der isolierten Hornhaut wurde von SÖLLNER und HOCKWIN auf eine Verminderung der Adenosinphosphatgehalte zurückgeführt; sie fanden in der getrübbten Hornhaut einen niedrigeren ATP/ADP-Quotienten als in der frischen Hornhaut. REIM und LICHTER bestätigten vor kurzem diese Ansicht durch Versuche mit

isolierten Kaninchenhornhäuten, die in einer feuchten Kammer in Luft gelagert wurden. Die Eintrübung der Hornhaut erfolgte in zeitlichem Zusammenhang mit dem Abfall des ATP/ADP-Quotienten in der gesamten Hornhaut von 5 auf 1; in der vorausgehenden Lagerungsperiode von 50 Stunden war der Quotient konstant geblieben. SOLLNER fand ein geringeres Gefälle des Energiestatus in der gesamten Hornhaut entsprechend seinem Normalwert des ATP/ADP-Quotienten von 1,33.

In den eigenen Versuchen wurde der isolierten Rinderhornhaut durch Aufbewahrung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre der Sauerstoff entzogen. Die Hornhaut war kurz darauf hauchzart getrübt. Die Bestimmung der Adenosinphosphatgehalte ergab, daß bereits nach einer Stunde in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre der ATP/ADP-Quotient von 16,6 in vivo auf 3,5 abgefallen war. Es bestand also eine enge Beziehung zwischen dem Abfall des hohen Energiepotentials im Epithel und der Eintrübung der Hornhaut.

Nach Sauerstoff-Ausschluß in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre begann das Gewebe zu glykolysieren: der Lactat-Gehalt im Epithel der isolierten Hornhaut war nach wenigen Stunden stark vermehrt. Die hohen ATP/ADP-Quotienten im atmenden Hornhautepithel fielen mit Einsetzen der Glykolyse auf Werte von etwa 3.

Ähnliche Veränderungen des Metabolitstatus wurden auch in anderen Geweben bei Anaerobiose beobachtet. Außerordentlich schnell änderte sich der ATP/ADP-Quotient nach Versuchen von HOHORST in der ischämischen Rattenleber: innerhalb von 5 bis 15 Sekunden sank der Quotient von 3,5 auf 1. In der ischämischen Tränendrüse (REIM) fiel der ATP/ADP-Quotient wesentlich langsamer nach 60 bis 120 sec. von 3,5 auf 1,5. In der vorliegenden Untersuchung wurde die erste Bestimmung der Metabolitgehalte im Epithel der Rinderhornhaut erst nach einer Stunde durchgeführt. Zu dieser Zeit betrug der ATP/ADP-Quotient bereits 3 (Abb.1, S.21). Es ist zu vermuten, daß schon vor Ablauf einer Stunde der Abfall des ATP/ADP-Quotienten eingetreten ist.

Während die ATP/ADP-Quotienten auf etwa 3 abfielen, stiegen die Gehalte von FDP und G-6-P mit Einsetzen der Glykolyse

in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre an (Abb.2, S.22; Tab.7, S.27). Dafür sprach auch die entsprechende Abnahme des Glucose-Gehaltes in den ersten Stunden der Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre. Zwar besitzt das Hornhautepithel mit seinem Glykogen eine beträchtliche Energiereserve; in 1 Hornhautepithel des Rindes beträgt der Glykogenvorrat 1-1,5 mg. Nach HERRMANN und HICKMAN wird Glykogen in der isolierten Hornhaut mit einer Geschwindigkeit von 25  $\mu\text{g/h}$  abgebaut. Bei unseren Versuchen wird das Glykogen sicherlich bald verbraucht, da bei unseren Lagerungsbedingungen keine Metabolite von außen zugeführt wurden. Außer dem Glykogen kommen auch andere Stoffe als Energiequellen für die Hornhaut in Betracht, z.B. nach BERARDINIS und DE VINCENTIIS wahrscheinlich auch Fettsäuren.

Nach dem initialen Abfall stieg der ATP/ADP-Quotient bei längerer Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre wieder auf etwa 6 an. Ein methodischer Fehler, der zur Sauerstoff-Atmung geführt haben konnte, war durch Prüfung der  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre ausgeschlossen worden (Seite 5). Auch fiel der ATP-Gehalt stetig während der ganzen Versuchsdauer. Die niedrigen ATP/ADP-Quotienten von 3 zu Beginn der Lagerung resultierten aus dem initialen Anstieg der ADP-Gehalte. Mit ihrem anschließenden Abfall stellte sich wieder ein Quotient von etwa 6 ein (Abb.1, S.24; Tab.5, S.26). Dann blieb der ATP/ADP-Quotient von 6 in der glykolysierenden Rinderhornhaut über  $33\frac{1}{2}$  Stunden konstant. Nach Rückführen der Hornhäute in Luft stieg der ATP/ADP-Quotient im Epithel wieder an (Abb.6, S.30). - Wenn die Hornhaut aber weiter in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre gelagert wurde, fiel der ATP/ADP-Quotient mit dem Abfall aller Metabolitgehalte weiter ab. Dabei wurde die Hornhaut vollständig trübe.

## Die Redox-Quotienten im Hornhautepithel des Rindes bei Lagerung der Hornhaut in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

Im cytoplasmatischen Raum der Zelle laufen auch jene drei Reaktionen ab, die Reduktions- bzw. Oxydationsschritte der Glykolysekette darstellen:

- 1) Die oxydative Gärungsreaktion der Glykolyse
- 2) Pyruvat + DPNH + H<sup>+</sup>  $\longrightarrow$  Lactat + DPN<sup>+</sup>
- 3) DAP + DPNH + H<sup>+</sup>  $\longrightarrow$   $\alpha$ -GP + DPN<sup>+</sup>.

Die Gleichungen stellen Fließgleichgewichte des Redox-Systems dar. Das Verhältnis ihrer Metabolitgehalte spiegelt den Redox-Status des zytoplasmatischen DPN/DPNH-Systems wieder.

HORRST fand in der ischämischen Rattenleber einen Anstieg von Lactat sowie der L/P- und G/D-Quotienten. Die Anfangsgeschwindigkeit der Milchsäurebildung gilt als Maß für den Substratfluß über die Glykolysekette. Er betrug in den Versuchen von HORRST bei der ischämischen Rattenleber maximal 1700  $\mu\text{mol/g/h}$ . In der ischämischen Tränendrüse (REIM) stieg der Lactatgehalt unter vergleichbaren Bedingungen nur um 60  $\mu\text{mol/g/h}$ ; er lag damit etwa gleich hoch wie im Skelettmuskel (50  $\mu\text{mol/g/h}$ ). Diese Werte wurden bei 37°C gemessen.

Bei unseren Untersuchungen verdoppelte sich der Lactat-Gehalt in der ersten Stunde. Die Milchsäurebildung betrug in dieser Zeit 3,5  $\mu\text{mol/g frisch/h}$  bei 20°C in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (Tab.3, S.23). Mit Hilfe der RGT-Regel <sup>x</sup>) errechnet sich ein Wert von 2,5 (Faktor)  $\times$  3,5 = 8,8  $\mu\text{mol/g/h}$  bei 37°C. - Ob die Anfangsgeschwindigkeit der Milchsäurebildung höher liegt als der von uns gemessene Ein-Stunden-Wert, bleibt fraglich. - Die Lactatbildung der gesamten Kaninchenhornhaut (REIM) war in vergleichbarer Zeit mit etwa 2,0  $\mu\text{mol/g/h}$  geringer (bei 22°C).

Der Redox-Quotient L/P im Epithel der Rinderhornhaut war nach 1 Stunde in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre verdoppelt. Nach 30 Stunden war er auf das Fünffache angestiegen - entsprechend der Zu-

<sup>x</sup>) Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel.

nahme des Lactat-Gehaltes. Die G/D-Quotienten verminderten sich dagegen während der Lagerung, mit Ausnahme des Minuten-Wertes. Die Gehalte von  $\alpha$ -GP und DAP lagen zum Teil an der unteren Grenze der Nachweisbarkeit, so daß sich Meßfehler sehr stark auswirkten. Der DAP-Gehalt war nach 2 Stunden auf das Fünffache angestiegen; der  $\alpha$ -GP-Gehalt war nach 2 Stunden um das  $1\frac{1}{2}$ -fache vermehrt. DELBRÜCK fand, daß  $\alpha$ -Gp in vivo durch das Hornhautepithel rasch oxidiert wird. Man kann aus diesem Befund auf eine ausreichend hohe Aktivität der  $\alpha$ -Glycerophosphat-Oxydase schließen. Das Verhältnis der LDH- zur GDH-Aktivität beträgt im Epithel der Kaninchenhornhaut 10000. Eine derart hohe LDH/GDH-Relation ist nur aus einigen malignen Tumoren bekannt, die wahrscheinlich keine GDH besitzen. Die GDH-Aktivität lag bei Enzymbestimmungen häufig an der unteren Grenze der Nachweisbarkeit (REIM). Über die Bedeutung der GDH im Stoffwechsel des Hornhautepithels kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen keine verbindliche Aussage gemacht werden.

Die Beobachtung an Kaninchenhornhäuten (REIM, LICHTE), daß in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre eine lineare Beziehung zwischen Redox-Potential L/P und Energie-Potential ATP/ADP besteht, wurde bereits von HOHORST für den anaerob arbeitenden Muskel und von REIM für die ischämische Tränendrüse nachgewiesen. Die Mechanismen, die einer Kopplung dieser wichtigen Stoffwechselgrößen zugrunde liegen, sind unbekannt. Abbildung 5 (S.25), welche die Bestimmungen beider Quotienten sowohl für den in vivo Zustand als auch für Anaerobiose und für die Reconstitution in Luft zusammenfaßt, läßt eine Beziehung der Quotienten unter diesen verschiedenen Bedingungen nicht erkennen.

## Die Änderungen der Metabolitgehalte des Epithels nach Rückführung anaerob gelagerter Hornhäute in Luft.

Bis zu 30 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre gelagerte Rinderhornhäute zeigten eine zarte bis milchige Trübung. Der Entzug von Luft-Sauerstoff hatte im Hornhautepithel zu niedrigen ATP/ADP-Quotienten geführt. Die Analyse der Gehalte von Lactat und  $\alpha$ -GP wies auf eine glykolytische Stoffwechsellage im Epithel hin: die Lactat- und  $\alpha$ -GP-Gehalte waren angestiegen. Auch die Gehalte von G-6-P und FDP waren während der ersten Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre vermehrt. Wichtigen Aufschluß über die Höhe der Redox-Potentiale gab der Anstieg der L/P-Quotienten.

Durch die Rückführung der anaerob gelagerten Hornhäute in Luft ging die Eintrübung mit bloßem Auge betrachtet zurück: die zuvor zart getrübbten Hornhäute wurden wieder klar; nach 20 bis 30 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre milchig getrübbte Hornhäute wiesen nach 2 Stunden Aufenthalt in Luft nur noch eine zarte Trübung auf.

Der Zunahme der Transparenz in Luft entsprachen die Veränderungen der Gehalte an energiereichem Phosphat: die ATP-Gehalte im Hornhautepithel waren wieder angestiegen. Der Anstieg der ATP/ADP-Quotienten erreichte die Höhe der in vivo Werte. Das Gleichgewicht der Adenylat-Kinase-Reaktion, ausgedrückt in der scheinbaren Gleichgewichtskonstanten  $Q_{\text{AdK}}$ , näherte sich der in vivo gefundenen Relation an. Aus dem Verhalten der ATP/ADP- und der L/P-Quotienten ergab sich, daß die Änderungen der absoluten Gewebsgehalte nicht zufällig waren; die L/P-Quotienten fielen in Luft ab. Dieser Abfall resultierte nicht aus einer Abnahme der Lactat-Gehalte - diese blieben gleich hoch -, sondern aus dem Anstieg von Pyruvat. Ferner verminderte sich der FDP-Gehalt, der zu Beginn der Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre erhöht war, nach Rückführen der Hornhäute in Luft auf den in vivo Gehalt.

Diese Befunde besagen, daß die Veränderungen des Stoffwechsels im Epithel der isolierten Hornhaut durch  $\text{CO}_2$  -

Atmosphäre reversibel waren, wenn wieder Luft-Sauerstoff zur Verfügung stand. Erstens schienen die Zellfunktionen, die der Aufrechterhaltung der Transparenz dienen, selbst nach zarter bis milchiger Eintrübung der Hornhaut wiederherstellbar. Zweitens spricht der Anstieg der ATP/ADP - Quotienten im Hornhautepithel nach Rückführung in Luft für eine Wiederaufnahme des oxydativen Stoffwechsels. So konnte in diesen Versuchen gezeigt werden - wie nach den Lagerungsversuchen in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre bereits vermutet wurde -, daß die Atmungsfunktion des Epithels und die Transparenz der Hornhaut in engem Zusammenhang stehen. Daraus wird der Schluß gezogen, daß das Epithel an der Entwässerung der Hornhaut mit dem Energiestoffwechsel seiner Zellen maßgeblich beteiligt ist. Denn in diesen Zellen stiegen nach Rückführen der Hornhäute in Luft die ATP/ADP-quotienten stark an, während die Hornhauttrübung verschwand. Die Funktion des Endothels blieb in diesen Versuchen unberücksichtigt.

Drittens kam es in Luft im hornhautepithel zu einem Abfall der Redox-quotienten L/P, die infolge der Glykolyse in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre angestiegen waren. Daß die Lactat-Gehalte unverändert hoch blieben, erklärt sich daraus, daß in der isolierten Hornhaut nicht - wie in vivo - Lactat durch das Kammerwasser fortgeschafft werden konnte.

In vivo ist die gefäßlose Cornea auf Sauerstoff-Zufuhr von außen angewiesen: LANGHAM hat gezeigt, daß das Epithel den Sauerstoff aus der Atmosphäre im Tränenfilm gelöst aufnimmt und während des Schlafes von der Lidconjunctiva erhält. LANGHAM beobachtete bei Trägern von Skleraschalen Epitheltrübungen, die nach Abnehmen der Schalen zurückgingen. SMELSER leitete beim Menschen mit Hilfe von luftdichten Schutzbrillen Stickstoff über die Cornea. In einigen Stunden kam es zum Epithel- und Stroma-Oedem. Durch Ausschluß von Luft-Sauerstoff war in beiden Fällen die Atmung des Epithels verhindert worden. HARRIS und DAVSON zeigten, daß Quellung und Trübung der Hornhaut reversibel sind, wenn sie durch Abkühlung hervorgerufen wurden ( "temperature reversal effect" ). Wird nämlich die Hornhaut in Luft mit

normaler Temperatur zurückgelegt, verschwindet die Trübung, sofern Epithel und Endothel intakt sind.

In den Versuchen an der isolierten Rinderhornhaut war die Reversibilität der Trübung ebenfalls an ein intaktes Epithel gebunden. Die Intaktheit des Epithels hing von der Dauer der Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre ab: nach 30 Stunden war das Hornhautepithel durch Rückführung in Luft noch imstande, seine Zellfunktionen wiederaufzunehmen.

Dauerte die Lagerung jedoch länger als 30 Stunden, z.B. 50 Stunden, führte die Gewebsalteration zur irreversiblen Schädigung der Stoffwechselmechanismen: die Hornhaut blieb nach Rückführen in Luft getrübt; der ATP-Gehalt stieg nicht wieder an, der ATP/ADP-Quotient blieb erniedrigt.

Nachdem REIM und LICHTER durch das zeitliche Zusammentreffen von Hornhauttrübung und Abfall des ATP/ADP-Quotienten in der gesamten Hornhaut auf die Beziehung zwischen Transparenz und Energiestatus in der Hornhaut hingewiesen haben, und nachdem REIM und SCHMIDT zeigen konnten, daß ein Absinken des ATP/ADP-Quotienten im Hornhautepithel von einer Trübung begleitet wird, wurde mit den vorgelegten Versuchen ein weiterer Hinweis geliefert, daß die Transparenz der Hornhaut vom Energiestatus des ATP/ADP-Systems im Hornhautepithel abhängig ist.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Beziehungen zwischen der Hornhauttrübung und dem Energiestoffwechsel des Hornhautepithels wurden an Rinderhornhäuten untersucht, die in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre aufbewahrt und anschließend in Luft zurückgebracht wurden. Die Änderungen der Gehalte von ATP, ADP, AMP, GLUCOSE, G-6-P, FDP, DAP,  $\alpha$ -GP, LACTAT und PYRUVAT unter den verschiedenen Bedingungen wurden im enzymatisch-optischen Verfahren bestimmt.

- 1) Mit Hilfe eines geeigneten Frierstopverfahrens wurden die Metabolitgehalte in Annäherung an den in vivo Status des Epithels bestimmt.
- 2) Die in vivo Normalwerte des Hornhautepithels des Rindes zeichneten sich durch sehr hohe ATP/ADP-Quotienten aus; einige Werte betrugen mehr als 20. Die ATP/ADP-Quotienten lagen höher als im Hornhautepithel des Kaninchens, in der Leber, im Muskel und in der Tränendrüse. Insgesamt lagen die Metabolitgehalte des Epithels sowie deren Quotienten in derselben Größenordnung wie bei den zum Vergleich angeführten Geweben.
- 3) Mit dem Entzug von Luft-Sauerstoff bei Lagerung in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre kam es sofort zur Eintrübung der isolierten Hornhaut. Gleichzeitig fielen die ATP/ADP-Quotienten auf niedrige Werte. Die L/P-Quotienten stiegen an; die Gehalte von FDP und G-6-P waren im Anfang erhöht, während der Glucose-Gehalt vermindert war. Diese Veränderungen sprachen für eine glykolytische Stoffwechsellage im Epithel unter diesen Lagerungsbedingungen. Während 30 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre nahm die Trübung der Hornhaut weiter zu; die ATP/ADP-Quotienten im Epithel lagen konstant bei etwa 6. Nach 50 Stunden in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre waren die Hornhäute vollkommen trübe; die Metabolitgehalte waren stark vermindert.
- 4) Durch Rückführung in Luft wurden zart getrübte Hornhäute wieder klar. Die ATP/ADP-quotienten stiegen wie-

der auf ihre in vivo Normalwerte an. Die während der Glykolyse angestiegenen L/P-Quotienten fielen in Luft ab. Diese Befunde ließen erkennen, daß der oxydative Stoffwechsel im Epithel noch nach 33 1/2 Stunden in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre funktionsfähig war, wenn wieder Luft-Sauerstoff zur Verfügung stand. Durch die Analyse der Adenosinphosphat-Gehalte konnte die enge Beziehung zwischen dem Energiestatus des ATP/ADP-Systems im Hornhautepithel und der Transparenz der Hornhaut gezeigt werden.



A N H A N G



## Abkürzungen

|                  |                                                      |
|------------------|------------------------------------------------------|
| Ad K             | Adenylatkinase (Myokinase)                           |
| ADP              | Adenosindiphosphat                                   |
| Ald              | 1,6-di-phosphofructaldolase                          |
| AMP              | Adenosinmonophosphat                                 |
| $\Sigma$ AD      | Summe der Adenosinphosphate                          |
| ATP              | Adenosintriphosphat                                  |
| BTS              | Brenztraubensäure                                    |
| c                | mg / ml                                              |
| DAP              | Dihydroxyacetonphosphat                              |
| DPN <sup>+</sup> | Diphosphopyridinnucleotid, oxydiert                  |
| DPNH             | Diphosphopyridinnucleotid, reduziert                 |
| DLT              | Athylendiaminotetraessigsäure                        |
| FDP              | Fructose-1,6-diphosphat                              |
| GAP              | Glycerinaldehyd-3-phosphat                           |
| G / D            | $\alpha$ -Glycero-phosphat / Dihydroxyacetonphosphat |
| GDH              | $\alpha$ -Glycero-phosphat-Dehydrogenase             |
| $\alpha$ -GP     | $\alpha$ -Glycero-phosphat = Glycerin-1-phosphat     |
| G-1-P            | Glycerin-1-phosphat                                  |
| G-6-P            | Glucose-6-phosphat                                   |
| G-6-PDH          | Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase                     |
| HK               | Hexokinase                                           |
| IDH              | Isocitronensäure-Dehydrogenase                       |
| LDH              | Lactat-Dehydrogenase                                 |
| L / P            | Lactat / Pyruvat                                     |
| LDH              | Malat-Dehydrogenase                                  |
| MyK              | Myokinase                                            |
| OAA              | Oxalacetat                                           |
| PEP              | Phosphoenolpyruvat                                   |
| PK               | Pyruvatkinase                                        |
| $\omega$ AdK     | Scheinbare Gleichgewichtskonstante der Ad K-Reaktion |
| TIM              | Triosephosphatisomerase                              |
| TPN <sup>+</sup> | Triphosphopyridinnucleotid, oxydiert                 |
| TPNH             | Triphosphopyridinnucleotid, reduziert                |
| TRAP             | Triäthanolamin-Puffer                                |

| Hornhaut-Lactat-<br>Nummer | BTS   | L/P | $\alpha$ -GP | DAP  | G/E  | Malat | G-6-P | FDP | Glucose | ATP  | ADP  | ATP<br>ADP | AMP  | $\Sigma$ AD |
|----------------------------|-------|-----|--------------|------|------|-------|-------|-----|---------|------|------|------------|------|-------------|
| 1                          | 8050  | 310 | 25,9         | 28,4 | -    | -     | 448   | 71  | 138     | 1230 | 960  | 1830       | 0,50 | 1970 4760   |
| 2                          | 11900 | 466 | 23,5         | 44,5 | 65,5 | 0,7   | 337   | 251 | 133     | -    | 905  | 1200       | 0,76 | 1400 3505   |
| 3                          | 6210  | 256 | 24,3         | -    | 84,6 | -     | 355   | 233 | 113     | 882  | 2030 | 1090       | 1,86 | 1190 4310   |
| 4                          | 5560  | 270 | 21,0         | 84,4 | 53,4 | 2,5   | 439   | 132 | 126     | 1030 | 1320 | 1420       | 0,93 | 1210 3950   |

Tab.10: Einzelwerte der Metabolitgehalte im in situ abradieren Hornhautepithel des Rindes ( in nMol/g Feuchtgewicht ). Mittelwerte siehe Tab.1, Seite 15.

| Hornhaut-<br>Nummer | Lactat | BTS | L/P  | $\alpha$ -GP | DAP | G/D | Malat | G-6-P | FDP | Glucose | ATP  | ADP | $\frac{ATP}{ADP}$ | AMP | $\Sigma AD$ |
|---------------------|--------|-----|------|--------------|-----|-----|-------|-------|-----|---------|------|-----|-------------------|-----|-------------|
| 1                   | 6360   | 360 | 17,7 | 58           | -   | -   | 495   | 111   | 30  | 1730    | 4100 | 332 | 12,4              | 275 | 4707        |
| 2                   | 8300   | 262 | 31,8 | -            | -   | -   | 427   | -     | 29  | 3160    | 4850 | 485 | 10,0              | 182 | 5517        |
| 3                   | 10800  | 430 | 23,5 | 92           | 61  | 1,5 | 364   | -     | 56  | 1630    | 3560 | 344 | 10,6              | 162 | 4066        |
| 4                   | 11000  | 336 | 33,0 | 129          | 26  | 5,0 | 290   | 88    | 20  | 1580    | 3960 | 355 | 11,2              | 158 | 4473        |
| 5                   | 15300  | 294 | 52,7 | 122          | 39  | 3,1 | 523   | 273   | 16  | 1590    | 4660 | 595 | 7,9               | 281 | 5536        |
| 6                   | 25700  | 382 | 67,5 | 274          | -   | -   | 545   | 118   | 21  | 2420    | 4900 | 338 | 14,5              | 242 | 5480        |
| 10                  | 17600  | 450 | 39,0 | 177          | 96  | 1,8 | 302   | 136   | -   | 785     | 3020 | 260 | 11,6              | 160 | 3440        |

Tab.11: Einzelwerte der Metabolitgehalte im Hornhautepithel in Annäherung an den in vivo Status. Frierstopverfahren mit flachem Stempel: Normalwerte I. Dimension: nMol/g Frischgewicht. Mittelwerte siehe Tab.2, Seite 16.

| Hornhaut-<br>Nummer | Lactat | BTS | L/P  | $\alpha$ -GP | DAP  | G/D  | Malat | 3-6-P | FDP  | ATP  | ADP | ATP/ADP | AMP | $\Sigma$ AD |
|---------------------|--------|-----|------|--------------|------|------|-------|-------|------|------|-----|---------|-----|-------------|
| 30                  | 3680   | 189 | 19,5 | 232          | -    | -    | 630   | 155   | 55,8 | 4980 | 267 | 18,6    | -   | -           |
| 31                  | 1190   | 188 | 6,4  | 195          | 77,5 | 2,5  | -     | 324   | 35,8 | 4920 | 197 | 25,0    | -   | -           |
| 32                  | 2920   | 139 | 21,0 | -            | -    | -    | 316   | 93    | -    | 3390 | 150 | 22,6    | 268 | 3808        |
| 33                  | 3410   | 138 | 24,7 | -            | -    | -    | 340   | -     | -    | 3100 | 277 | 11,2    | 184 | 3561        |
| 34                  | -      | 219 | -    | -            | -    | -    | -     | 159   | 38,0 | 3500 | 240 | 14,6    | 139 | 3879        |
| 35                  | 4600   | 193 | 24,0 | -            | 13,5 | -    | 540   | 143   | 34,0 | 3520 | 206 | 17,2    | 160 | 3886        |
| 36                  | 4100   | 266 | 15,4 | -            | -    | -    | 547   | 111   | -    | 3800 | 295 | 15,4    | 344 | 4439        |
| 37                  | -      | 244 | -    | 239          | 23,0 | 10,3 | -     | 150   | 51,0 | 3520 | 257 | 13,7    | 325 | 4102        |
| 38                  | 5080   | 138 | 36,8 | -            | 24,0 | -    | 268   | 102   | 16,0 | 3240 | 235 | 13,8    | 205 | 3680        |
| 39                  | 2820   | 235 | 12,0 | -            | -    | -    | 240   | 118   | 23,0 | 2690 | 141 | 19,1    | 235 | 3066        |
| 40                  | 3460   | 228 | 15,4 | -            | 75,5 | -    | 590   | 287   | 53,0 | 3600 | 344 | 10,5    | 575 | 4519        |
| 43                  | 3800   | 173 | 22,0 | 270          | 32,0 | 8,4  | 423   | 72    | 37,0 | 2740 | 151 | 18,0    | 212 | 3103        |

**Tab.12:** Einzelwerte der Metabolitgehalte im Hornhautepithel in Annäherung an den in vivo Status durch Frierstop mit Hohlstempel = Normalwerte II. Dimension: nMol/g frisch. Mittelwerte siehe Tab.3, Seite 17.

| Stunden<br>in CO <sub>2</sub> | Lactat | BTS | L/P | α-GP | DAP | G/D | Malat | G-6-P | ADP | ATP  | ADP  | $\frac{ATP}{ADP}$ | AMP | ΣAD  |
|-------------------------------|--------|-----|-----|------|-----|-----|-------|-------|-----|------|------|-------------------|-----|------|
| 1                             | 9100   | 200 | 46  | 238  | -   | -   | 195   | 210   | 125 | 2260 | 780  | 2,9               | 500 | 3540 |
| 1                             | 6920   | 282 | 25  | 279  | 18  | 16  | 273   | 370   | 137 | 3220 | 740  | 4,4               | 425 | 4385 |
| 1                             | 7350   | 105 | 70  | 308  | 57  | 6   | 96    | 160   | 28  | 2700 | 480  | 5,6               | 238 | 3418 |
| 1                             | 5040   | 93  | 54  | 229  | 20  | 11  | 306   | 155   | 56  | 2360 | 1050 | 2,2               | 448 | 3658 |
| 2                             | 5100   | 114 | 45  | 380  | 190 | 2   | 330   | 114   | 227 | 2820 | 865  | 3,3               | -   | -    |
| 4                             | 8300   | 260 | 32  | 286  | 107 | 3   | 245   | -     | 194 | 2060 | 730  | 2,8               | -   | -    |
| 4                             | 12900  | 240 | 54  | 244  | 88  | 3   | 302   | -     | 163 | 1970 | 528  | 3,7               | -   | -    |
| 4 <sup>1/2</sup>              | 8150   | 84  | 98  | 318  | 124 | 3   | 279   | 63    | 115 | 2370 | 464  | 5,1               | 274 | 3108 |
| 4 <sup>1/2</sup>              | 13000  | 191 | 68  | 495  | 56  | 9   | 156   | 118   | 42  | 2670 | 340  | 7,8               | 326 | 3321 |
| 4 <sup>1/2</sup>              | 8800   | 93  | 96  | 400  | 56  | 7   | 241   | 49    | 89  | 2280 | 480  | 4,8               | 295 | 3055 |
| 10                            | 23300  | 485 | 48  | 207  | 57  | 4   | 300   | 61    | 58  | 1720 | 262  | 6,5               | 123 | 2105 |
| 10                            | 18800  | 144 | 130 | 1050 | 83  | 13  | 274   | 84    | 91  | 1920 | 580  | 3,3               | 398 | 2898 |
| 10                            | 12600  | 106 | 119 | 440  | 52  | 9   | 145   | 73    | 132 | 2100 | 440  | 4,8               | 342 | 2882 |
| 10                            | 10700  | 133 | 80  | 413  | 45  | 9   | 152   | 51    | 91  | 1550 | 310  | 5,0               | 268 | 2128 |
| 14                            | 23000  | 232 | 99  | 314  | 72  | 4   | 374   | 85    | 86  | 1770 | 184  | 9,6               | 139 | 2093 |
| 20                            | 13600  | 137 | 100 | 243  | 68  | 4   | 374   | -     | 103 | 1880 | 285  | 6,6               | 278 | 2443 |
| 26                            | 24800  | 236 | 105 | 158  | 32  | 5   | 356   | 157   | 18  | 790  | 187  | 4,2               | 87  | 1064 |
| 30                            | 22100  | 162 | 136 | 580  | 38  | 15  | 354   | -     | 47  | 1160 | 183  | 6,3               | 206 | 1549 |
| 30                            | 19400  | 129 | 150 | 163  | 22  | 7   | 250   | 23    | 22  | 1860 | 266  | 7,0               | 200 | 2326 |
| 33 <sup>1/2</sup>             | 28400  | 390 | 73  | 382  | 84  | 5   | 415   | 35    | 142 | 1160 | 171  | 6,8               | 185 | 1516 |
| 35                            | 35400  | 266 | 133 | 232  | 24  | 10  | 372   | 173   | 41  | 525  | 207  | 2,5               | 154 | 886  |
| 50                            | 26700  | 133 | 200 | 179  | -   | -   | 330   | 84    | 20  | 540  | 220  | 2,4               | 290 | 1050 |
| 51 <sup>1/2</sup>             | 40000  | 264 | 151 | 234  | -   | -   | 590   | -     | 61  | 1020 | 240  | 4,2               | 203 | 1463 |
| 59 <sup>1/2</sup>             | 25000  | 230 | 109 | -    | -   | -   | -     | 160   | 51  | 322  | 167  | 1,9               | 251 | 740  |
| 60                            | 24000  | 67  | 360 | 112  | -   | -   | 165   | 334   | 25  | 133  | 222  | 0,6               | 334 | 689  |
| 80                            | 19300  | 66  | 295 | 77   | -   | -   | 108   | 153   | 11  | 56   | 99   | 0,6               | 235 | 390  |
| 106 <sup>1/2</sup>            | 3660   | 42  | 86  | -    | -   | -   | 292   | 118   | -   | 61   | 28   | 2,1               | -   | 89   |

Tab. 13: Einzelwerte der Metabolitgehalte im Hornhautepithel bei Lagerung in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre  
( in nMol/g Frischgewicht ).

| Stunden<br>in CO <sub>2</sub> in O <sub>2</sub> | BTS | L/P | α-GP | DAP | G/D | Malat | G-6-P | FDP | ATP  | ADP | $\frac{ATP}{ADP}$ | AMP | ΣAD  |
|-------------------------------------------------|-----|-----|------|-----|-----|-------|-------|-----|------|-----|-------------------|-----|------|
| 1                                               | 1   | 49  | 319  | 30  | 11  | 292   | 71    | 13  | 3140 | 288 | 11,0              | 192 | 3620 |
| 1                                               | 2   | 40  | 252  | -   | -   | 278   | -     | 27  | 2740 | 189 | 14,5              | 262 | 3191 |
| 1                                               | 3   | 35  | 206  | -   | -   | 403   | 82    | -   | 3080 | 260 | 12,0              | 220 | 3560 |
| 4 1/2                                           | 1   | 41  | 290  | 14  | 20  | 425   | 108   | 62  | 2990 | 203 | 14,7              | 232 | 3425 |
| 4 1/2                                           | 2   | 56  | 485  | 6   | 85  | 190   | -     | 27  | 2520 | 262 | 9,6               | 134 | 2916 |
| 4 1/2                                           | 3   | 61  | 440  | 19  | 24  | 400   | 54    | 11  | 3150 | 257 | 12,3              | 252 | 3659 |
| 10                                              | 1   | 39  | 298  | 31  | 10  | 680   | -     | 78  | 3200 | 220 | 14,4              | 270 | 3692 |
| 10                                              | 2   | 56  | 283  | -   | -   | 334   | 85    | 45  | 2170 | 136 | 16,0              | 170 | 2476 |
| 20                                              | 2   | 56  | 262  | 23  | 12  | 455   | -     | 15  | 2020 | 238 | 8,5               | 159 | 2433 |
| 30                                              | 2   | 88  | 435  | 28  | 16  | 224   | -     | 32  | 1980 | 173 | 11,5              | 195 | 2348 |
| 50                                              | 2   | 72  | 215  | 24  | 9   | 254   | -     | 36  | 940  | 134 | 7,0               | 240 | 1314 |

Tab. 14: Die Metabolitgehalte im Hornhautepithel nach Rückführen anaerob gelagerter Hornhäute in Luft ( in mMol/g Frischgewicht ).

## LITERATURVERZEICHNIS

- ANSETH, A. Exp. Eye Res. 1, 106, 1961
- de BERARDINIS und de VINCENZIIS, M. Rass.ital.Ottal. 19, 164, 1950
- BUCHER, Th. und KLINGENBERG, M. Angew.Chemie 70, 17/18, 552, 1958
- CAIMETTES, L.u.a. Arch.Opth. Paris 16, 481-506, 1956
- DAVSON, H.: The Eye, Bd.1, Academic Press 1962, London New York
- DELBRÜCK, A. Klin.Wschr. 41, 10. Heft, 488, 1963
- DOHLMAN, C.H.: Metabolism of the corneal graft. In: The Transparency of the Cornea. Edit. W.S. Duke-Elder und E.S. Perkins, Blackwell Sci. Publ. Oxford 1960
- DUKE-ELDER, W.S., E.S. PERKINS: The Transparency of the Cornea. Blackwell Sci. Publ. Oxford 1960
- FRANCOIS, J., M. Rabaey: The anatomy of the cornea. In: The Transparency of the cornea. Edit. W.S. Duke-Elder, E.S. Perkins, Blackwell Sci. Publ. Oxford 1960
- GOEBELL, H. und KLINGENBERG, M. Biochem.Z. 340, 441, 1964
- HARRIS, J.E. Amer.J.Opth. 44, 262, 1957
- HEDBYS, B.O. Exp. Eye Res. 1, 81, 1961
- HERRMANN, H. und HICKMAN, F.H. Bull. Johns Hopkins Hosp. 82, 225; 82, 182; 82, 260, 1948
- HERRMANN, H. und LEBEAU, M. J. of Cell Biol. 13, 465, 1962
- HOHORST, H.J. Metabolitgehalte und Metabolitgleichgewichte in der quergestreiften Muskulatur der Ratte. Habil.-Schrift 1961
- HOHORST, H.J., KREUTZ, F.H., BÜCHER, Th. Biochem.Z. 332, 113, 1959
- HOHORST, H.J., KREUTZ, F.H., REIM, M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 159, 1961
- HOHORST, H.J., REIM, M., BARTELS, H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 137, 1962
- HOLT, C.v., LÜTH, H., HALLMANN, I., HOLT, L.v., VOELKER, L. Biochem.Z. 331, 239, 1959
- KALCKAR, H.M. J. Biol. Chem. 148, 127, 1943
- KAMAI, T. Acta Soc. Opth. Japan 63, 934, 1959
- KINOSHITA, J.H., MASURAT, T. Archiv Biochem. Biophys. 53, 9, 1954
- KINOSHITA, J.H., MASURAT, T. Amer. J. Opth. 48, II, 47, 1959
- KINOSHITA, J.H. J. Biol. Chem. 228, 247, 1957
- KUHLMAN, R.E. J. Cell. comp. Physiol. 53, 313, 1959

- LANGHAM, M.E. J. Physiol. 126, 396, 1954
- LANGHAM, M.E. Corneal metabolism and its influence on corneal hydration in the excised eye and in the living animal. In: The Transparency of the Cornea. Edit. J.S. Duke-Elder und E.S. Perkins, Blackwell, Oxford, 1960
- LANGHAM, M.E., TAYLOR, S. Brit. J. Ophth. 40, 321, 1956
- LAURENT, T.C., ANSETH, A. Exp. Eye Res. 1, 99, 1961
- LOHR, G.H., WALLER, H.D., GROSS, R. Dtsch. med. Wschr. 86, 897; 86, 946, 1961
- MAURICE, D.M.: The cornea and sclera. In: The Eye, Bd. 1, Edit. H. Davson, Academic Press 1962 London, New York
- PEDLER, C. Exp. Eye Res. 1, 236, 1962
- PIRIE, A., VAN HEYNINGEN, R. Biochemistry of the Eye, Blackwell Sci. Publ. Oxford 1956
- RAUEN, H.M.: Biochemisches Taschenbuch, 2. Teil, Springer Verlag 1964 Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York
- REIM, M. A.v. Graefes Archiv f. Ophth. 167, 559, 1964; 167, 549, 1964
- REIM, M. unveröffentlicht
- REIM, M., LICHTHE, H. A.v. Graefes Archiv f. Ophth. 168, 363, 1965
- REIM, M., SCHMIDT, F. A.v. Graefes Archiv f. Ophth. im Druck
- REIM, M., SCHMIDT, F., MEYER, D. Vortrag auf der 57. Versammlung der Dt. Ophth. Gesellsch., Heidelberg 1965: Die Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels im Hornhautepithel verschiedener Säugetiere.
- de ROTH, A. Arch. Ophth. N.Y. 45, 139, 1951
- ROHEN, J.W.: Das Auge und seine Hilfsorgane. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. III Haut und Sinnesorgane, 4. Teil, Springer Verlag Berlin, Göttingen Heidelberg, New York 1964
- SMEISER, G.K. Arch. Ophth. N.Y. 328-343, 1952
- SMEISER, G.K.: Morphological and functional development of the cornea. In: The Transparency of the Cornea. Edit. J.S. Duke-Elder und E.S. Perkins, Oxford, Blackwell Sci. Publ. 1960
- SOLLNER, F. A.v. Graefes Archiv f. Ophth. 165, 500, 1963
- SOLLNER, F., HOCKWIN, O. A.v. Graefes Archiv f. Ophth. 167, 467, 1964
- TAKAHASHI, G.H., FATT, I. Exp. Eye Res. 4, 4, 1965
- WALBOEK, A. van: Turgescence and swelling. In: The Transparency of the Cornea. Edit. J.S. Duke-Elder, E.S. Perkins, Blackwell Sci. Publ. Oxford 1960

Herrn Prof.Dr.W.Straub bin ich zu großem Dank verpflichtet, daß ich diese Untersuchung aufnehmen und an seiner Klinik vollenden konnte.

Auch danke ich Herrn Dr.M.Reim besonders für die fachliche und persönliche Unterstützung.

Fräulein Helga Siefert sei für die technische Assistenz sehr gedankt. Frau Ursprung verdanke ich die photographische Wiedergabe der Abbildungen.

Schließlich gilt mein Dank Herrn Dr.Dr.Wandt, dem Direktor des Marburger Schlachthofes, sowie den Angestellten des Schlachthofes für ihre freundliche Hilfe.

-----

Ermöglicht wurde diese Arbeit durch ein Promotionsstipendium der Stiftung Volkswagenwerk.

## LEBENS LAUF

Am 6.5.1942 wurde ich als Sohn des Erich Friedrich Meyer und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Harborth, in Berlin-Lichterfelde geboren. Neben drei Geschwistern wuchs ich in Marl im Ruhrgebiet auf und wurde im evangelischen Glauben unterrichtet. Nach dem frühen Tod meiner Mutter heiratete mein Vater die Musikpädagogin Maria Nölle. Mein Vater ist bei den Chemischen Werken Hülse als Exportkaufmann tätig. Nach der Volksschule besuchte ich seit 1952 die Albert-Schweitzer-Schule in Marl. Am 2.3.61 legte ich an diesem Neusprachlichen Gymnasium die Reifeprüfung ab.

Das Studium der Humanmedizin begann ich in Tübingen im Sommer 1961 mit Hilfe eines Stipendiums nach dem Honnefer Modell. Im Oktober 63 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab. Dann studierte ich sieben klinische Semester in Marburg und meldete mich zum Staatsexamen ab Februar 67.

Im Sommer 65 begann ich bei Herrn Professor Dr.med.W.Straub in der Universitäts-Augenklinik Marburg die vorliegende Dissertation "Über die Bedeutung des Energiestoffwechsels im Epithel der Rindercornea für ihre Transparenz". Herr Dozent Dr.med.h.c.Reim führte mich in die zur Ausführung der Versuche notwendigen biochemischen Methoden ein. Dank seiner Unterstützung schloß ich die Dissertation Ende 1966 ab. - 1966 wurde mir für acht Monate ein Promotionsstipendium der Stiftung Volkswagen gewährt.

Marburg, den 20.2.1967



MARL (437), Dormagenerstr.26

MARBURG (355), Waidmannsweg 16

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Tübingen: Brecht, Feneis, Graumann, Möhres, Mörike  
E.Müller, Nultsch, Tonutti, Weitzel sowie

in Marburg: Beckmann, Berendes, Braun-Falco, Buchholz,  
Dölle, du Mesnil de Rochemont, Exner, Ganz,  
Gedigk, Hamm, Herrmann, Heuser, Jacob, Lang,  
Linneweh, Löhr, Mann, Martini, Marx, Neubauer,  
Oehmig, Rohen, Schleyer, Schmid, Schwaiger,  
Siegert, Straub, Streicher, Würterle.





